

Philipps



Universität
Marburg

Strukturelle und funktionelle Charakterisierung
der epithelialen Adhäsine aus *Candida glabrata*

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Biologie

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Rike Diderrich

aus Marburg

Marburg an der Lahn, April 2014

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden unter der Leitung und Betreuung von Prof. Dr. Hans-Ulrich Mösch im Zeitraum von Oktober 2009 bis April 2014 an der Philipps-Universität Marburg durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation

am _____ 04.06.2014 _____ angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. Hans-Ulrich Mösch

Zweitgutachter: Prof. Dr. Lars-Oliver Essen

Tag der mündlichen Prüfung am _____ 13.06.2014 _____.

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Titel

**„Strukturelle und funktionelle Charakterisierung
der epithelialen Adhäsine aus *Candida glabrata*“**

selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

(Ort, Datum)

(Rike Diderrich)

meiner Mutti

und

meinen Eltern

gewidmet

Zusammenfassung

Der humanpathogene Pilz *Candida glabrata* ist ein opportunistischer Erreger, der bevorzugt die Schleimhäute von Säugetieren besiedelt. *C. glabrata* ist für etwa 15 % der Blutstrominfektionen bei Menschen verantwortlich und verursacht besonders bei immunsupprimierten Patienten schwere Infektionsverläufe. Wichtige Virulenzfaktoren von *C. glabrata* sind die epithelialen Adhäsine (Epa-Proteine), von denen der Pilz je nach Stamm bis zu 23 verschiedene Mitglieder besitzt und die für die erfolgreiche Kolonisierung des Wirtes entscheidend sind. Die Epa-Proteine sind mit den Flokkulinen der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* verwandt und gehören zu den Glycosylphosphatidylinositol-verankerten Zellwandproteinen (GPI-CWP). Sie besitzen eine typische, dreigeteilte Domänenstruktur, bei der die N-terminale A-Domäne für die Vermittlung der Adhäsion verantwortlich ist, die anschließende B-Domäne als Träger der A-Domäne fungiert und die C-terminale C-Domäne für die GPI-Verankerung in der Zellwand verantwortlich ist. Bisherige Untersuchungen an einigen Mitgliedern der Epa-Familie haben gezeigt, dass diese Adhäsine als Lektine fungieren und bestimmte Glykane auf der Oberfläche von Epithelzellen spezifisch erkennen und binden. Um die Struktur und Funktion der gesamten Epa-Protein-Familie im Detail zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit alle 17 EpaA-Domänen des *C. glabrata* Stammes CBS138 heterolog hergestellt und aufgereinigt. Anschließend wurden Ligandenbindungsspezifitätsprofile aller 17 EpaA-Domänen über *Glycan Array Screening* ermittelt, wobei sich ergab, dass etwa 2/3 der Epa-Proteine Galactoside bevorzugen. Weiterhin wurden die exakten Bindungsstärken bestimmter EpaA-Domänen zu ausgewählten Glykan-Liganden ermittelt, die im niedrigen mikromolaren Bereich liegen. Ebenso gelang auch die Strukturlösung von Epa6A und Epa9A mit verschiedenen Liganden. Dadurch konnten sowohl konservierte als auch variable Aminosäurereste identifiziert werden, die für die Affinität und Spezifität wichtig sind und die anschließend über gezielte Mutagenese genauer untersucht wurden. Um die Funktion der EpaA-Domänen auch systematisch *in vivo* zu untersuchen und mit den biochemischen Ergebnissen zu vergleichen, wurden 15 der EpaA-Domänen in einem heterologen Expressionssystem einzeln an die Zelloberfläche von *S. cerevisiae* gebracht und deren Fähigkeit zur Adhäsionsvermittlung an menschliche Epithelzellen und abiotische Oberflächen bestimmt. Zusammenfassend gibt diese Arbeit einen detaillierten Einblick in die Struktur und Funktion einer kompletten Multiprotein-Familie, wobei die präzise Charakterisierung der Ligandenbindungsstellen von besonderem Interesse ist, da diese für die Pathogenität von *C. glabrata* entscheidend sind und als mögliche Ziele für die zukünftige Entwicklung dringend benötigter, neuer Antimykotika in Frage kommen.

Summary

The human pathogenic fungus *Candida glabrata* is an opportunistic pathogen that preferentially colonizes the mucosa of mammals. *C. glabrata* is responsible for about 15 % of blood stream infections in humans and causes particularly serious infections in immunocompromised patients. Important virulence factors of *C. glabrata* are the epithelial adhesins (Epa proteins) that are crucial for the successful colonization of the host. Depending on the strain background, certain fungal strains express up to 23 different members of this protein family. Epa proteins are related to the flocculins in the baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* and belong to the group of glycosylphosphatidylinositol-anchored cell wall proteins (GPI-CWP). They have a typical three-part domain structure in which the N-terminal A domain is responsible for mediating the adhesion, followed by the B domain, which acts as a carrier of the A domain and the C-terminal C domain, which cross-links the adhesin covalently to the cell wall. Previous studies on some members of the Epa family have shown that these adhesins are lectins that identify and specifically bind certain glycans on the surface of epithelial cells. To investigate the structure and function of the entire Epa protein family in detail, all 17 EpaA domains of *C. glabrata* strain CBS138 were heterologously produced and purified in this work. Subsequently, the ligand binding specificity patterns of all 17 EpaA domains were determined by glycan array screening, which revealed that about 2/3 of the Epa proteins prefer galactosides as binding partners. Moreover, the exact binding strengths of certain EpaA domains to selected glycan ligands were determined, which were in a micromolar range. Furthermore the protein structure of Epa6A and Epa9A with various ligands has been resolved. Thereby it was possible to identify both conserved and variable amino acid residues that are important for the binding affinity and specificity, and which were then investigated in more detail by means of targeted mutagenesis. In order to systematically investigate the function of the EpaA domains *in vivo* and to compare them with the biochemical results, 15 of the 17 EpaA domains were analyzed in a heterologous expression system, in which each one of the proteins were targeted to the cell surface of *S. cerevisiae*, so their ability to mediate adhesion to human epithelial cells and abiotic surfaces could be determined. In summary this work gives a detailed insight into the structure and function of a complete multi- protein family. Thereby the precise characterization of ligand binding sites is of particular interest, since these are critical for the pathogenicity of *C. glabrata* and are potential targets for future development of urgently needed, new antifungal agents.

Abkürzungen und Fachbegriffe

Å	Ångstrom (1 Å = 100 pm = 10 ⁻¹⁰ m)
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
C-terminal	carboxyterminal
CFG	<i>Consortium for Functional Glycomics</i>
CWP	Zellwandprotein (<i>cell wall protein</i>)
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxy-Nukleosid-5'-triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
kb	Kilobasenpaare
M	Molar
MPA	<i>Mammalian Printed Array</i>
N-terminal	aminoterminal
OD	Optische Dichte
ORF	Offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
PAGE	Polyacrylamidelektrophorese
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>Polymerase chain reaction</i>)
PEG	Polyethylenglycol
PMSF	Phenylmethylen-sulfonylfluorid
rpm	Umdrehung pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
v/v	<i>volume per volume</i>
w/v	<i>weight per volume</i>
YEPD	<i>Yeast Extract/ Peptone/ Dextrose</i>

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Phylogenie verschiedener <i>Candida</i> Spezies und weiterer <i>Saccharomyceten</i> .	2
Abbildung 2: Bekannte Zellmorphologien von <i>C. glabrata</i> .	4
Abbildung 3: Die zwei phänotypischen <i>Switching</i> - Systeme von <i>C. glabrata</i> .	5
Abbildung 4: Biofilmbildung durch <i>C. albicans</i> und <i>C. glabrata</i> .	6
Abbildung 5: Manifestierte Infektionen mit <i>Candida</i> Spezies.	7
Abbildung 6: Ergosterol-Biosyntheseweg und Wirkungsmechanismen von Antimykotika.	11
Abbildung 7: Die pilzliche Zellwand.	13
Abbildung 8: Grundstruktur der GPI-verankerten Zellwandproteine.	15
Abbildung 9: Lokalisation der <i>EPA</i> -Gene.	17
Abbildung 10: Struktur der A-Domäne von Epa1.	19
Abbildung 11: Glykan-Bindungsprofile der A-Domänen von Epa1, Epa6 und Epa7.	21
Abbildung 12: Strukturbasiertes Sequenzalignment der EpaA-Domänen aus <i>C. glabrata</i> und Flo5A aus <i>S. cerevisiae</i> .	26
Abbildung 13: Strukturbasierte Phylogenie der EpaA-Domänen.	28
Abbildung 14: SDS-PAGE von EpaA-Domänen nach Größenausschlusschromatographie.	29
Abbildung 15: CD-Referenzspektrum zur Berechnung von Sekundärstrukturelementen.	31
Abbildung 16: Fern-UV-Spektren von Epa1A, Epa3A, Epa6A, Epa7A, Epa9A und Epa23A.	32
Abbildung 17: Versuchsdurchführung mit Bindungsspezifitätsprofil der Epa1A-Domäne.	34
Abbildung 18: Verwandtschaft der 17 EpaA-Domänen basierend auf den dazugehörigen Glykan-Profilen.	36
Abbildung 19: Best-Binder Analyse der 17 EpaA-Domänen.	37
Abbildung 20: Ligandenbindungsprofile der EpaA-Domänen unter Berücksichtigung terminaler Galactoside.	38
Abbildung 21: Bindung von Disacchariden durch Mitglieder der Gruppe 1A.	40
Abbildung 22: Bindung von Disacchariden durch Mitglieder der Gruppen 1B, 1C und 2A.	41
Abbildung 23: Bindung von Disacchariden durch Mitglieder der Gruppe 1D.	42
Abbildung 24: Bindung von Disacchariden durch EpaA-Domänen der Gruppe 2B.	43
Abbildung 25: Bindung von Monosacchariden durch EpaA-Domänen.	46
Abbildung 26: Bindungsspezifitätsprofile der Epa1A-Domäne bei zwei Proteinkonzentrationen.	47
Abbildung 27: Ligandenbindungsprofile der EpaA-Domänen bei verschiedenen Proteinkonzentrationen unter Berücksichtigung terminaler Galactoside.	48

Abbildung 28: Bindung von Disacchariden durch Epa1A und Epa9A bei verschiedenen Proteinkonzentrationen.	49
Abbildung 29: Bindung von Disacchariden durch Epa12A und Epa23A bei verschiedenen Proteinkonzentrationen.....	50
Abbildung 30: Bindungsstärken zwischen den A-Domänen von Epa1, Epa7, Epa3, Epa22, Epa6, Epa12 und Ep23 und dem T-Antigen	52
Abbildung 31: Ermittelte Bindungskonstanten von Epa1A, Epa7A und Epa6A bei der Bindung an verschiedene Disaccharide.	54
Abbildung 32: Vergleich der mittels Fluoreszenztitration und Glykan-Array gemessenen, relativen Bindungsaffinitäten von Epa1A, Epa7A und Epa6A an verschiedenen Liganden.	54
Abbildung 33: Proteinstrukturen der A-Domänen von Epa6 und Epa9.	57
Abbildung 34: Bindungstasche von Epa6A mit verschiedenen gebundenen Liganden.	58
Abbildung 35: Bindungstasche von Epa9A mit verschiedenen gebundenen Liganden.	59
Abbildung 36: Relative Adhäsion der EpaA-Domänen an Caco-2 Epithelzellen nach zwei Stunden.	63
Abbildung 37: Relative Adhäsion der EpaA-Domänen an Polystyrol.	64
Abbildung 38: Waschtest zur Analyse der Bindung von EpaA-Domänen an Agar.....	66
Abbildung 39: Adhäsionstests mit <i>S. cerevisiae</i> Stämmen, die verschiedene, mutierte Epa1A-Domänen auf ihrer Oberfläche präsentierten, an Caco-2 Zellen, Polystyrol und Agar.	69
Abbildung 40: Adhäsionstests mit <i>S. cerevisiae</i> Stämmen, die verschiedene EpaA CBL2-Austauschvarianten auf ihrer Oberfläche präsentierten, an Caco-2 Zellen, Polystyrol und Agar.	72
Abbildung 41: Ligandenbindungsprofile von EpaA CBL2-Austauschvarianten unter Berücksichtigung terminaler Galactoside.	77
Abbildung 42: Bindung von Disacchariden durch die A-Domänen von Epa1A ^{CBL2Epa9} und Epa9A ^{CBL2Epa1} im Vergleich zu den A-Domänen von Epa1 und Epa9.	80
Abbildung 43: Bindung von Disacchariden durch die Epa3A ^{CBL2Epa1} -Domäne im Vergleich zu den A-Domänen von Epa1 und Epa3.	81
Abbildung 44: Bindung von Disacchariden durch die Epa3A ^{CBL2Epa2} -Domäne im Vergleich zu den A-Domänen von Epa2 und Epa3.	82
Abbildung 45: Bindung von Monosacchariden durch EpaA CBL2-Austauschvarianten.	84
Abbildung 46: Konservierte Strukturelemente der Epa-Familie.	86
Abbildung 47: Vergleich der atomaren Strukturen von Epa1A, Epa6A und Epa9A.	87
Abbildung 48: Vergleich der Bindungstaschen der Epa1A-Domänen mit einer Mutation in W198.....	89
Abbildung 49: Modell der Bindungstasche der EpaA-Domänen.	92
Abbildung 50: Bindungstaschen und Bindungsprofile von Epa1A und Epa7A.....	94
Abbildung 51: Bindungstaschen und Bindungsprofile von Epa1A und Epa3A.....	96

Abbildung 52: Vereinfachte Darstellung der Bindungstasche und atomare Struktur von Epa9A.	98
Abbildung 53: Bindungstaschen und Bindungsprofile von Epa6A, Epa13A und Epa11A.	100
Abbildung 54: Bindungstasche von EpaA-Domäne die sulfatierte Galactoside binden.	103
Abbildung 55: Bindungsprofile von EpaA-Domänen der Gruppe 2 und Epa1A.	105
Abbildung 56: Ligandenbindungsprofile von Varianten der EpaA-Domänen zu terminalen Galactosiden.	107
Abbildung 57: Bindung von Disacchariden durch die Epa1A-Varianten im Vergleich zu den zugehörigen unveränderten EpaA-Domänen.	109
Abbildung 58: Herstellung des Hefe-Expressionsplasmids BHUM2157.	127
Abbildung 59: Getestete Expressionsbedingungen.	151
Abbildung 60: Bindung eines Proteins mit His ₆ -Tag an den Ni-NTA-Komplex.	153
Abbildung 61: Chromatogramm und SDS-PAGE der Ni-NTA-Affinitätschromatographie.	155
Abbildung 62: Chromatogramm und SDS-PAGE der Größenausschlusschromatographie.	155
Abbildung 63: Jablonski-Diagramm verschiedener Energieübergänge.	162
Abbildung 64: Nachweis der EpaA-Domänen auf der Oberfläche von <i>S. cerevisiae</i> mittels Immunfluoreszenz.	177
Abbildung 65: Versuchsablauf des Adhäsionstests an Epithelzellen.	179
Abbildung 66: Schmelzkurven von Epa1A, Epa3A, Epa6A, Epa7A, Epa9A und Epa23A.	192
Abbildung 67: Bindungsspezifitätsprofile der EpaA-Domänen.	194
Abbildung 68: Bindungsspezifitätsprofile der A-Domänen von Epa1, Epa9, Epa12 und Epa23 bei verschiedenen Proteinkonzentrationen.	195
Abbildung 69: Bindungsspezifitätsprofile von EpaA CBL2-Austauschvarianten.	196
Abbildung 70: Fluoreszenzmessungen einzelner EpaA-Domänen mit verschiedenen Glykanliganden.	201

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Summary	II
Abkürzungen und Fachbegriffe	III
Abbildungsverzeichnis	IV
Inhaltsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 Pilze in der Medizin und Industrie	1
1.2 Der humapathogene Hefepilz <i>C. glabrata</i>	2
1.2.1 Allgemeine Charakteristika von <i>C. glabrata</i>	2
1.2.2 Klinisches Bild	7
1.2.3 Virulenzfaktoren von <i>C. glabrata</i>	8
1.2.4 Therapiemöglichkeiten von Candidosen	9
1.3 Pilzliche Adhäsine	12
1.3.1 Die Zellwand und Zellwandproteine von <i>Saccharomyceten</i>	12
1.3.2 Adhäsine	14
1.3.3 Die <i>EPA</i> -Familie von <i>C. glabrata</i>	16
1.3.4 Die A-Domäne der Epa-Proteine	18
1.4 Zielsetzung	22
2 Ergebnisse	24
2.1 Bioinformatische Analyse der EpaA-Domänen	24
2.2 Heterologe Herstellung der EpaA-Domänen	29
2.2.1 Heterologe Überproduktion und Aufreinigung der EpaA-Domänen	29
2.2.2 Bestimmung des Sekundärstrukturgehalts und der thermischen Stabilität	31
2.3 <i>Glycan Array Screening</i>	33
2.3.1 Ermittlung von Bindungsspezifitätsprofilen der 17 EpaA-Domänen	33
2.3.2 Funktionsbasierte Verwandtschaft der EpaA-Domänen	35
2.3.3 Klassifizierung anhand terminaler Glykanstrukturen	38

2.3.4	Bindung isolierter Disaccharide.....	39
2.3.5	Bindung an isolierte Monosaccharide.....	45
2.3.6	CFG-Titrationsanalysen mit Epa1A, Epa9A, Epa12A und Epa23A	47
2.3.6.1	Bindungsspezifitätsprofile bei verringerter Proteinkonzentration	47
2.3.7	Klassifizierung anhand terminaler Glykanstrukturen	48
2.3.7.1	Bindung isolierter Disaccharide.....	49
2.4	Biochemische Bestimmung der Ligandenbindungs-konstanten von EpaA-Domänen bei der Bindung an verschiedenen Galactosiden	51
2.4.1	Quantifizierung der Bindung von Epa1, Epa7, Epa3A, Epa22A, Epa6A, Epa12A und Epa23A an das T-Antigen	51
2.4.2	Bestimmung der Ligandenbindungskonstanten von Epa1A, Epa7A und Epa6A bei der Bindung an verschiedene Galactoside	53
2.5	Kristallographische Untersuchungen von Epa6A und Epa9A.....	55
2.5.1	Kristallisation, Datensammlung, Prozessierung, Phasenlösung, Modellierung und Verfeinerung	55
2.5.2	Strukturanalyse	56
2.6	Funktionelle Analyse der Adhäsion von EpaA-Domänen <i>in vivo</i> mit <i>S. cerevisiae</i> als Modellorganismus	60
2.6.1	Herstellung von <i>S. cerevisiae</i> Stämmen, die einzelne EpaA-Domänen auf ihre Oberfläche präsentieren	60
2.6.2	Adhäsion der EpaA-Domänen an Epithelzellen	61
2.6.3	Adhäsion der EpaA-Domänen an Polystyrol	63
2.6.4	Adhäsives Wachstum der EpaA-Domänen auf Agar.....	65
2.7	Funktionelle Analyse konservierter Strukturelemente <i>in vivo</i> mit <i>S. cerevisiae</i> als Modellorganismus	67
2.7.1	Identifizierung und Mutation konservierter Strukturelemente.....	67
2.7.2	Einfluss des DcisD-Motivs an der Bindungsvermittlung	68
2.7.3	Einfluss des Tryptophanrestes W198 an der Bindungsvermittlung.....	69
2.7.4	Einfluss der Disulfidbrücke zwischen L1 und L2 an der Bindungsvermittlung.....	70
2.8	Funktionelle <i>in vivo</i> Analyse variabler Bereiche	71
2.8.1	Identifizierung und Mutation variabler Bereiche.....	71
2.8.2	Einfluss der CBL2-Region auf die Adhäsion an Caco-2 Zellen und Agar.....	73

2.8.2.1	Austausch der CBL2-Region der A-Domäne von Epa1A durch die CBL2-Region der anderen Epa-Untergruppen	73
2.8.2.2	Austausch der CBL2-Region der A-Domäne von Epa2.....	73
2.8.2.3	Austausch der CBL2-Region der A-Domäne von Epa3A.....	74
2.8.2.4	Austausch der CBL2-Region der A-Domäne von Epa6.....	74
2.8.2.5	Austausch der CBL2-Region der A-Domäne von Epa9.....	75
2.8.3	Einfluss der CBL2-Region auf die Adhäsion an Polystyrol.....	75
2.9	Biochemische Charakterisierung variabler Bereiche	76
2.9.1	Ermittlung der Bindungsspezifitätsprofile von EpaA-Domänen mit ausgetauschter CBL2-Region mittels <i>Glycan Array Screening</i>	76
2.9.2	Klassifizierung anhand terminaler Glykanstrukturen.....	77
2.9.3	Bindung isolierter Disaccharide	79
2.9.4	Bindung isolierter Monosaccharide.....	84
3	Diskussion	85
3.1	Alle EpaA-Domänen sind PA14/Flo5-ähnliche Lektine mit hoher struktureller Ähnlichkeit und konservierten Elementen für die Ligandenbindung.....	85
3.1.1	Das DcisD-Motiv vermittelt Ligandenbindung durch Komplexierung eines Calciumions.....	86
3.1.2	Die aromatischen Bestandteile des Tryptophans in L3 vermitteln Bindung an endständige Galactoside.....	88
3.1.3	Die Verknüpfung von L1 mit L2 trägt zur Bindungsvermittlung der EpaA-Domänen bei	91
3.2	Spezifitätsvermittelnde Strukturelemente innerhalb der Epa-Familie.....	92
3.2.1	Spezifitätsvermittlung von Epa1A, Epa7A, Epa3A und Epa22A (Gruppe 1A).....	93
3.2.1.1	Epa7A vermittelt spezifischere Bindung als Epa1A	93
3.2.2	Epa1A und Epa3A vermitteln trotz geringer struktureller Verwandtschaft gleiche Spezifität	95
3.2.3	Spezifitätsvermittlung durch Epa9A (Gruppe 1B)	97
3.2.4	Spezifitätsvermittlung durch Epa6A, Epa13A (Gruppe 1C) und Epa11A (Gruppe 2A).....	99
3.2.5	Spezifitätsvermittlung durch Epa12A, Epa15A, Epa23A und Epa10A (Gruppe 1D).....	102

3.2.6	Spezifitätsvermittlung durch Epa2A, Epa8A, Epa19A, Epa20A und Epa21A (Gruppe 2B)	104
3.3	Die CBL2-Region ist nur teilweise an der Vermittlung der Spezifität beteiligt.....	106
3.3.1	Austausch der CBL2-Region von Epa1A durch die CBL2-Region von Epa2A, Epa3A und Epa6A	108
3.3.2	Austausch der CBL2-Region von Epa1A durch die von Epa2A	108
3.3.3	Austausch der CBL2-Region von Epa1A durch die von Epa3A	108
3.3.4	Austausch der CBL2-Region von Epa1A durch die von Epa6A	110
3.3.5	Austausch der CBL2-Region von Epa1A durch die von Epa9A sowie Austausch der CBL2-Region von Epa9A durch die von Epa1A	110
3.3.6	Austausch der CBL2-Region von Epa3A durch die von Epa1A und Epa2A	111
3.4	Ausblick.....	112
3.4.1	<i>C. glabrata</i> und der Mensch: Diversifizierung der adhäsiven Eigenschaften als Infektionsstrategie.....	112
4	Material.....	115
4.1	Geräte.....	115
4.2	Verbrauchsmaterialien	116
4.3	Chemikalien.....	116
4.4	Verwendete Saccharide und Oligosaccharide	116
4.5	Enzyme	117
4.6	Antikörper.....	117
4.7	Primer	117
4.8	Vektoren	121
4.8.1	pCR-Blunt II-TOPO.....	121
4.8.2	pJET1.2	121
4.8.3	pET-28a(+)-Vektor	121
4.8.4	YCplac33	122
4.9	Verwendete Konstrukte	122
4.9.1	Vorläuferplasmide zur Sicherung der PCR-Produkte.....	122
4.9.2	<i>E. coli</i> Expressionsplasmide	125
4.9.3	Hefe-Expressionsplasmide.....	127
4.10	Stämme und Zelllinien.....	129

4.10.1 Bakterienstämme	129
4.10.1.1 <i>E. coli</i> DH5α.....	129
4.10.1.2 <i>E. coli</i> TOP10F'	130
4.10.1.3 <i>E. coli</i> SHuffle T7 Express.....	130
4.10.2 Hefestämme	130
4.10.2.1 <i>S. cerevisiae</i> BY4741	130
4.10.2.2 <i>C. glabrata</i> ATCC2001	131
4.10.3 Zelllinien.....	131
4.10.3.1 Caco-2 ATCC HTB-37.....	131
4.11 Medien, Puffer und Stammlösungen	132
4.11.1 Medien.....	132
4.11.1.1 Nährmedien für <i>E. coli</i>	132
4.11.1.2 Nährmedien für <i>S. cerevisiae</i>	133
4.11.1.3 Nährmedien für Caco-2 Zellen.....	134
4.11.2 Puffer	135
4.11.3 Stammlösungen	137
5 Methoden.....	138
5.1 Molekularbiologische Methoden.....	138
5.1.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)	138
5.1.1.1 Einfügen von Restriktionsschnittstellen	139
5.1.1.2 Sequenzspezifische Mutagenese (<i>quick-change mutagenese</i>)	140
5.1.1.3 Kolonie-PCR	141
5.1.2 Präparation von DNA nach der PCR.....	141
5.1.3 Agarosegelelektrophorese	142
5.1.4 DNA-Extraktion aus Agarosegelen	143
5.1.5 Konzentrationsbestimmung von DNA	143
5.1.6 Ligation von DNA-Fragmenten.....	144
5.1.7 Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen.....	145
5.1.8 Transformation chemisch kompetenter Zellen	145
5.1.9 Präparation von Plasmid-DNA.....	146
5.1.10 Präparation von Plasmid-DNA per Alkoholpräzipitation	146
5.1.11 Analytischer und präparativer Restriktionsverdau von DNA	147
5.1.12 Kultivierung von <i>E. coli</i>	148

5.1.13	Stammhaltung	148
5.1.14	Klonierung von <i>EPA</i> -Genen in <i>E. coli</i> Expressionsvektoren	149
5.2	Proteinchemische Methoden	150
5.2.1	Heterologe Produktion von Proteinen im analytischen Maßstab	150
5.2.2	Analytischer Zellaufschluss	151
5.2.3	Heterologe Produktion von Protein im präparativen Maßstab	151
5.2.4	Präparativer Zellaufschluss	152
5.2.5	Aufreinigung der Proteine mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie	152
5.2.6	Aufreinigung der Proteine mittels Größenaufschlusschromatographie	154
5.2.7	Präparative heterologe Überexpression und Aufreinigung der EpaA-Domänen	154
5.2.8	Konzentration von Proteinen mittels Ultrafiltration	156
5.2.9	Umpuffern der Proteinlösungen mittels Ultrafiltration	156
5.3	Analytische Methoden	157
5.3.1	SDS-PAGE	157
5.3.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen	158
5.3.3	Proteinmassenspektrometrie	159
5.3.4	CFG-Analysen	159
5.3.5	Spektroskopie mit zirkular polarisiertem Licht	160
5.3.6	Fluoreszenz-Spektroskopie	161
5.4	Proteinkristallographische Methoden	164
5.4.1	Kristallisationsscreening	164
5.4.2	Reproduktion und Optimierung von Proteinkristallen	166
5.4.3	<i>Micro-seeding</i>	167
5.4.4	<i>Soaking</i> von Kristallen mit potentiellen Glykanliganden	167
5.4.5	Vorbereiten der Kristalle	168
5.4.6	Röntgenbeugung	169
5.4.7	Prozessierung	169
5.4.8	Phasenbestimmung	170
5.4.9	Verfeinerung	171
5.4.10	Darstellen der Strukturen	172
5.5	<i>in vivo</i> Untersuchung der EpaA-Domänen	172

5.5.1	Herstellung kompetenter <i>S. cerevisiae</i> Zellen	172
5.5.2	Herstellung von Plasmiden zur Expression der <i>EPAA</i> -Domänen in <i>S. cerevisiae</i>	173
5.5.3	Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	175
5.5.4	Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	175
5.5.5	Immunfluoreszenz-Mikroskopie	175
5.5.6	Bestimmung der Zellzahl	178
5.5.7	Adhäsionstest an Epithelzellen	178
5.5.7.1	Kultivierung adhärenter Caco-2 Zellen	180
5.5.7.2	Aussähen in 24-well Platte	180
5.5.7.3	Auftauen und Einfrieren von Zellen	181
5.5.8	Adhäsionstest an Polystyrol	181
5.5.9	Adhäsionstest auf Agar	182
6	Anhang	183
6.1	Sequenzen	183
6.2	UniProt- und Gen-ID	191
6.3	Sequenzidentität	191
6.4	Schmelzkurven	192
6.5	CFG-Requests	192
6.6	Ligandenbindungsspezifitätsprofile	197
6.7	Fluoreszenztitration	201
6.8	Kristallisationsscreens	201
6.9	Datensammlungs- und Verfeinerungsstatistiken	202
6.10	In der PDB deponierte Proteinstrukturen	203
7	Literaturverzeichnis	205
8	Lebenslauf	218
9	Danksagung	220

1 Einleitung

1.1 Pilze in der Medizin und Industrie

Pilze repräsentieren ein eigenes Reich unter den Eukaryoten und bilden ein Viertel der Biomasse unseres Planeten. In der Natur leisten sie einen immensen Beitrag für den Kreislauf von organischen Stoffen und sorgen beispielsweise als Symbionten von Pflanzenwurzeln für die Nährstoffaufnahme aus dem Boden (Hibbett, *et al.*, 2007). Pilze werden aber auch seit tausenden von Jahren in hohem Maße von Menschen genutzt. Zum einen werden sie bei der Produktion von Lebensmitteln wie Brot, Wein und Bier verwendet, können aber auch teilweise direkt verzehrt werden und gelten aufgrund des hohen Gehalts an Vitaminen und essentiellen Aminosäuren als hervorragender Nährstofflieferant. Des Weiteren können sie für die Produktion von Bioethanol oder in der pharmazeutischen Industrie zur Synthese einiger Antibiotika verwendet werden (Kingsman, *et al.*, 1987, Tottrup & Carlsen, 1990, Cavalieri, *et al.*, 2003). In der biologischen Grundlagenforschung spielen Pilze ebenfalls eine große Rolle, so ist beispielsweise der Hefepilz *Saccharomyces cerevisiae* einer der herkömmlichen eukaryotischen Modellorganismen (Hinnen, *et al.*, 1978, Goffeau, *et al.*, 1996). *Komagatella pastoris* hingegen, besser bekannt unter dem Namen *Pichia pastoris*, findet immer mehr Anwendung in der Proteinproduktion, besonders von humanen Proteinen, da dieser Pilz in der Lage ist, eukaryotische Proteine mit ihrer nativen Glykosylierung zu synthetisieren (Cereghino, *et al.*, 2002, Cregg, *et al.*, 2009).

Viele Pilze sind jedoch nicht nur für den Menschen von Nutzen, sondern können zum Beispiel als Pflanzenpathogene durch den Befall von Nutzpflanzen zu großen wirtschaftlichen Schäden in der Landwirtschaft, aber auch zu Unterernährung und Hunger in Drittweltländern beitragen (Sitte, 2002). Zudem konnten von den über eine Million bekannten Pilzarten 400 als direkt humanpathogen eingestuft werden (Fridkin & Jarvis, 1996, Guarro, *et al.*, 1999). Dazu gehören auch zwei Mitglieder der *Saccharomycetales*, zum einen *Candida albicans* und zum anderen der in dieser Arbeit untersuchte Hefepilz *Candida glabrata*. In gesunden Menschen treten diese humanpathogenen Pilze als Kommensalen auf, sind Teil der menschlichen Flora, ohne Schäden oder Krankheiten hervorzurufen und führen nur in seltenen Fällen zu

Infektionen (Nguyen, *et al.*, 1996, Sobel, *et al.*, 1998, Gulia, *et al.*, 2010). Bei immunkompromittierten Menschen hingegen stellen Infektionen mit *Candida*-Spezies ein immer größer werdendes Problem dar und sind mittlerweile der vierthäufigste Grund von Infektionen durch Krankenhausaufenthalte (Pappas, *et al.*, 2009). So werden 8 – 10 % der nosokomialen Infektionen auf *Candida*-Spezies zurückgeführt (Sandven, 2000, Blumberg, *et al.*, 2001). Dabei gewinnt vor allem *C. glabrata* immer mehr an medizinischer Bedeutung, da dieser Hefepilz im Laufe der Zeit Resistenzen gegen die meisten bekannten Antimykotika entwickelt hat (Willocks, *et al.*, 1991).

1.2 Der humapathogene Hefepilz *C. glabrata*

1.2.1 Allgemeine Charakteristika von *C. glabrata*

C. glabrata gehört taxonomisch in die Abteilung der *Ascomycota*, in die Klasse der *Saccharomycetales* und in die Familie der *Saccharomycetes* (Csank & Haynes, 2000). Das haploide Genom des einzelligen Pilzes wurde 2004 sequenziert und weist eine Größe von 12.3 Mbp auf, welche auf 13 Chromosomen verteilt sind (Tabelle 1) (Dujon, *et al.*, 2004).

Obwohl *C. glabrata* und *C. albicans* ein ähnliches Krankheitsbild hervorrufen, unterscheiden sich die beiden phylogenetisch stark voneinander, sodass davon ausgegangen werden kann, dass sich die Assoziation an den Wirt unabhängig voneinander entwickelt hat (Abbildung 1).

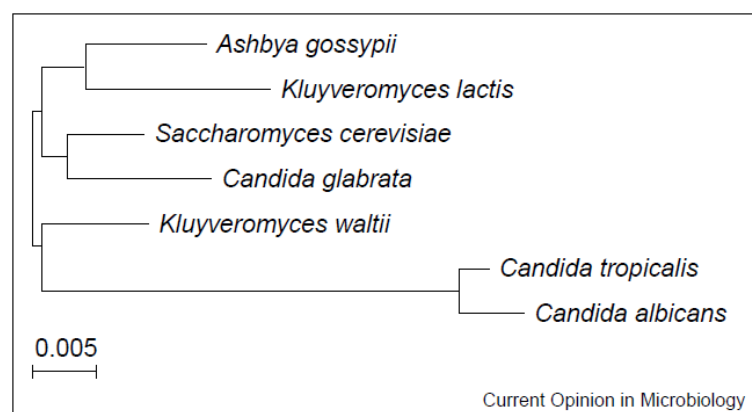


Abbildung 1: Phylogenie verschiedener *Candida* Spezies und weiterer *Saccharomyceten*.

Der phylogenetische Baum wurde mittels *neighbor-joining* Methode erstellt. Dazu wurden zunächst die 18S Sequenzen mit Hilfe von *ClustalW* aneinander ausgerichtet. *C. glabrata* ist phylogenetisch näher mit *S. cerevisiae* als mit anderen pathogenen *Candida* Spezies verwandt (Kaur, *et al.*, 2005).

Hingegen weist das Genom von *C. glabrata* eine viel größere Ähnlichkeit zu dem seiner nicht-pathogenen Verwandten auf, zum Beispiel der Bäckerhefe *S. cerevisiae* aus der Familie der *Saccharomycetaceae* (Kaur, *et al.*, 2005). Dies spiegelt sich in der 65 %igen Übereinstimmung von orthologen Proteinen und einem geringen GC-Gehalt von etwa 38 % wieder (Dujon, *et al.*, 2004). Jedoch ist die Stoffwechselkapazität von *C. glabrata* aufgrund seiner kommensalistischen Lebensweise im Vergleich zur Bäckerhefe deutlich reduziert. So hat *C. glabrata* wahrscheinlich im Lauf der Evolution Gene verloren, die eine wichtige Rolle bei der Aufnahme von Glukose und Saccharose spielen, an der Biosynthese von Thiamin, Pyridoxin und Nicotinsäure oder am Phosphat-, Stickstoff- oder Schwefel-Metabolismus beteiligt sind (Kaur, *et al.*, 2005).

Tabelle 1: Vergleich von *C. glabrata*, *C. albicans*, und *S. cerevisiae*.

Die Tabelle wurde in Anlehnung an Kaur *et al.*, 2005 erstellt und zeigt eine Zusammenfassung der genetischen Charakteristika von *C. glabrata*, *C. albicans*, und *S. cerevisiae*.

	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>	<i>S. cerevisiae</i>
Ploidie	Haploid	Diploid/Tetraploid	Haploid/Diploid
Genomgröße	13 Chromosomen, 5274 ORFs	8 Chromosomen, 6563 ORFs	16 Chromosomen, 6607 ORFs
sexueller Zyklus	Unbekannt	Unvollständig	Bekannt
Echte Hyphen	Nein	Ja	Nein
Pseudohyphen	Ja (selten)	Ja	Ja
phänotypisches „Switching“	Vorhanden	Vorhanden	Nicht vorhanden
Biofilm-Formation	Ja	Ja	Ja
Adhäsine	Lektine (Epa-Familie)	Lektine (Hwp1, Als-Familie)	Lektine (Flo-Familie), Agglutinine
natürliches Habitat	Pflanzen, Früchte, Boden, Insekten, mikrobielle Flora des Menschen	Mikrobielle Flora des Menschen	Pflanzen, Früchte
Auxotrophien	Niacin, Thiamin, Pyridoxin	keine	keine
Wirkung von Azolen	Resistent	Empfindlich	Empfindlich
Pathogenität	Opportunistisch	Opportunistisch	Apathogen
Infektionsformen	Lokal (Haut, Schleimhaut, disseminierend)	Lokal (Haut, Schleimhaut, disseminierend)	Nicht infektiös

C. glabrata ist ein asexueller, einzelliger Organismus, der hauptsächlich in seiner Hefeform vorkommt und sich durch Aussprossung der Tochterzelle aus der Mutterzelle vermehrt, wobei die Ausknospung unipolar erfolgt (Fidel, *et al.*, 1999). Die Zellen

kennzeichnen sich durch eine rundliche bis ellipsoide Form mit einem Durchmesser von 1 bis 4 μm . *C. glabrata* ist im Gegensatz zu *C. albicans* nicht in der Lage, echte Hyphen zu bilden, lediglich unter Stickstoffmangel konnte pseudohyphales und röhrenförmiges Wachstum beobachtet werden (Abbildung 2) (Odds, *et al.*, 1997, Csank & Haynes, 2000, Lachke, *et al.*, 2002).

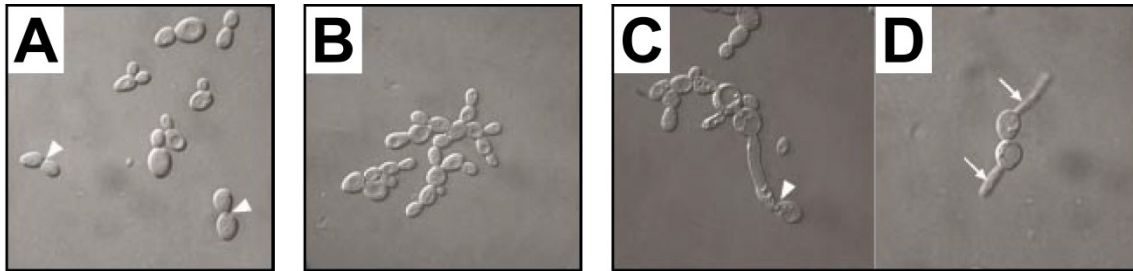


Abbildung 2: Bekannte Zellmorphologien von *C. glabrata*.

C. glabrata weist drei verschiedene Zellmorphologien auf: einzellig, knospende Hefeform (A), filamentöse Pseudohyphen (B), längliche bis röhrenartige Form, die auch zur Knospung befähigt ist (C und D) (Lachke, *et al.*, 2002).

Obwohl im Lebenszyklus von *C. glabrata* noch keine sexuelle Phase nachgewiesen wurde und man davon ausgeht, dass sich der Hefepilz nur mitotisch durch Zellsprossung vermehrt, besitzt er die genetischen Grundvoraussetzungen zur sexuellen Reproduktion (Barnett, 1983). Es wurden bereits verschiedene zu *S. cerevisiae* orthologe Gene im Genom von *C. glabrata* nachgewiesen, die ausschließlich an Paarung, Meiose und Konjugation beteiligt sind (Wong, *et al.*, 2003, Dodgson, *et al.*, 2005). So konnten Gene für die drei *Mating Type Loci* (*MTL1* – 3) und den Paarungstypwechsel beobachtet werden, was darauf hindeutet, dass *C. glabrata* eventuell einen bis jetzt unentdeckten Sexualzyklus besitzt (Srikantha, *et al.*, 2003).

Des Weiteren weist *C. glabrata* unter bestimmten Bedingungen morphologische Veränderungen auf, dazu zählen zum Beispiel das phänotypische *Switching*, die Pigmentierung von Kolonien und das Wachstum als Biofilm. Diese drei Charakteristika könnten eine entscheidende Rolle für die Pathogenität von *C. glabrata* spielen (Soll, 1988). Das phänotypische *Switching* beschreibt das spontane, reversible Umschalten zwischen unterschiedlichen Phänotypen der Hefeform, wovon zwei unabhängige Systeme in *C. glabrata* beobachtet werden können (Lachke, *et al.*, 2002). Im *Core Switching*-System wird bei Wachstum auf CuSO_4 -haltigem Medium zwischen den Koloniefärbungen Weiß, Hellbraun, Dunkelbraun und stark Dunkelbraun unterschieden (Abbildung 3).

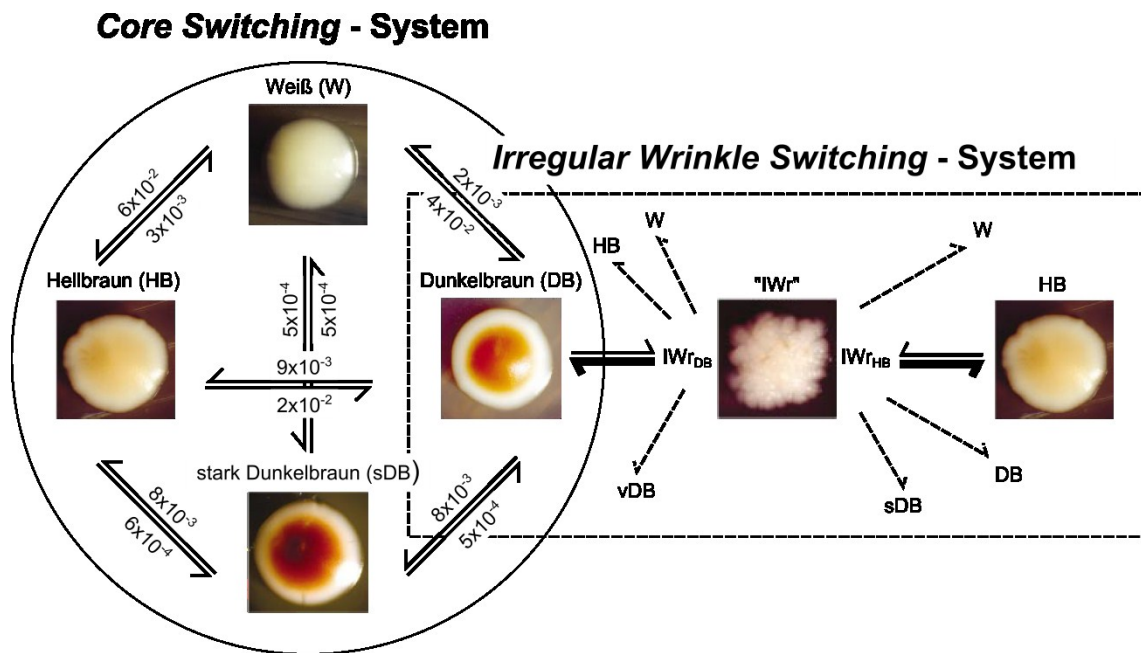


Abbildung 3: Die zwei phänotypischen Switching - Systeme von *C. glabrata*.

C. glabrata besitzt zwei Switching-Systeme: Erstens das Core Switching-System mit vier unterschiedlich farbigen Phänotypen Weiß (W), Hellbraun (HB), Dunkelbraun (DB) und stark Dunkelbraun (sDB) auf CuSO_4 -haltigem Medium. Die Zahlen an den Pfeilen geben die Frequenz an, mit der die Hefezellen ihren Phänotyp wechseln. Zweitens das Irregular Wrinkle Switching-System, welches über einen Phänotyp mit rauem und faltigen Erscheinungsbild und pseudohyphalem Wachstum (Irregular Wrinkle (IW_r)) zwischen den Hellbraunen und den Dunkelbraunen Phänotypen des Core Switching-System wechselt. Das Gleichgewicht ist deutlich zu den Phänotypen des Core Switching-System verschoben, was durch die unterschiedlichen Strichstärken verdeutlicht wird. Modifiziert nach (Lachke, *et al.*, 2002).

Dabei beruhen die vier verschiedenen Phänotypen auf der chemischen Umsetzung von Kupfersulfat zu braunem Kupfer(II)-sulfid, was auf den Grad der Expression des *MT-II*-Gens zurückzuführen ist, welches für Metallothioneinproteine kodiert (Lachke, *et al.*, 2000). Als Zweites ist das *in vitro* beobachtete Irregular Wrinkle Switching-System zu nennen, bei dem der Pilz zwischen dem normalen Hefewachstum und einem pseudohyphalen Wachstum, dem Irregular Wrinkle umschaltet (Abbildung 3). Der Irregular Wrinkle-Phänotyp kennzeichnet sich im Gegensatz zur normalerweise glatten Kolonieoberfläche durch ein rauhes und faltiges Erscheinungsbild (Lachke, *et al.*, 2002). Im Lauf von Infektionen mit *C. glabrata* konnten Anreicherungen bestimmter beschriebener Phänotypen an verschiedenen Infektionsorten beobachtet werden (Brockert, *et al.*, 2003). Aufgrund bisheriger Untersuchungen wird erwartet, dass die phänotypische Variabilität die Virulenz von *C. glabrata* beeinflusst und dem Pilz so ermöglicht sich dem Immunsystems seines Wirts zu entziehen (Bouchara, *et al.*, 2000, Vargas, *et al.*, 2004, Srikantha, *et al.*, 2008). Die oben beschriebenen, unterschiedlichen Koloniefärbungen sind nicht auf die Produktion von Pigmenten zurück zu führen.

Trotzdem ist *C. glabrata* in der Lage, Pigmente aus verschiedenen Indol-Komponenten zu synthetisieren, wenn er auf Medium kultiviert wird, das ausschließlich Tryptophan als Stickstoffquelle enthält (Mayser, *et al.*, 2007). Ob diese Fähigkeit die Virulenz von *C. glabrata* beeinflusst, und es zu einer Pathogenitätssteigerung wie im Fall der Melaninsynthese von *Aspergillus fumigatus* und *Cryptococcus neoformans* kommt, bei denen die Einlagerung von Melanin in der Zellwand eine größere Stabilität gegen enzymatische Lyse und mechanischen Stress vermittelt, ist bis zum heutigen Zeitpunkt jedoch noch nicht geklärt (Casadevall, *et al.*, 2000, Langfelder, *et al.*, 2003).

Obwohl *C. glabrata* nicht in der Lage ist, Hyphen auszubilden, besitzt er trotzdem die Fähigkeit in Form von Biofilmen zu wachsen (Abbildung 4) (Nikawa, *et al.*, 1997, Kumamoto, 2002, da Silva, *et al.*, 2012). Diese Fähigkeit ermöglicht die Kolonisation verschiedenster Oberflächen und führt zu Persistenz in Kliniken, da *C. glabrata* durch Biofilmbildung in der Lage ist alloplastische Materialien wie Prothesen und Katheter zu besiedeln (Douglas, 2003).

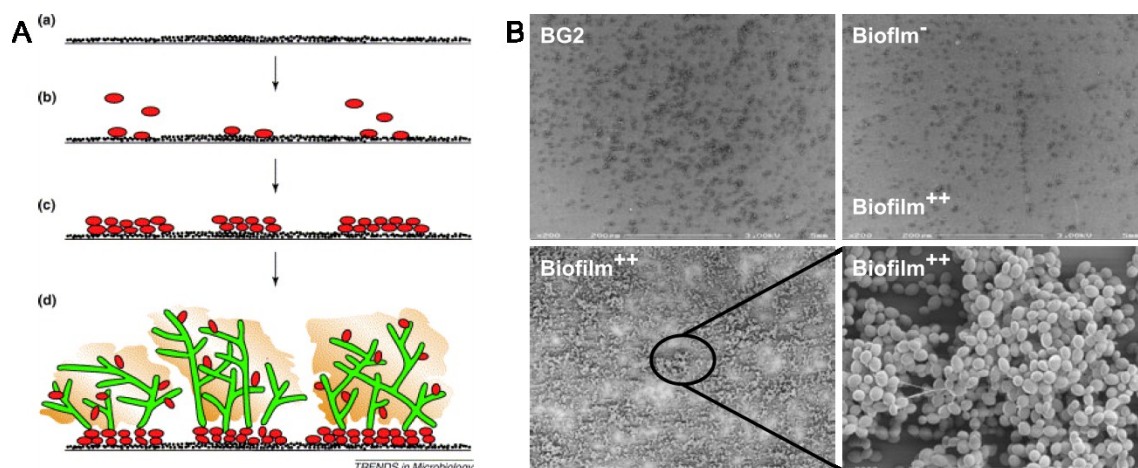


Abbildung 4: Biofilmbildung durch *C. albicans* und *C. glabrata*.

A) Schematische Darstellung der Stufen während der Biofilmbildung durch *C. albicans*: (a) und (b) einzelne Zellen adhären an einer Oberfläche, (c) diese Zellen bilden Mikrokolonien, die eine extrazelluläre Matrix produzieren, (d) der wachsende Biofilm zeigt Zellen mit myzelartigem Wachstum und Hefezellen, die in die extrazelluläre Matrix eingebettet sind (Douglas, 2003). B) *C. glabrata* BG2 Wildtypzellen sind zur Ausbildung von Biofilmen auf Plastik befähigt. Biofilm⁻-Stämme zeigen nur geringe Biofilmbildung, wohingegen Biofilm⁺⁺-Stämme große, komplexe Biofilm-Formationen ausbilden (Iraqi, *et al.*, 2005).

Die zwei Adhäsine *EPA6* und *EPA7* aus der großen Familie der *EPA* Gene (epithelial adhesin) scheinen an der Formation von Biofilmen beteiligt zu sein. Zum einen ist ihre Expression innerhalb von Biofilmen erhöht und zum anderen bewirkt ihre Deletion eine verringerte Fähigkeit zur Biofilm Ausbildung (Iraqi, *et al.*, 2005). Des Weiteren

weisen *C. glabrata*-Zellen innerhalb von Biofilm-Formationen eine geringere Sensitivität gegenüber Antimykotika auf und es wird vermutet, dass dies auf Veränderungen der Zellwandkomposition zurückzuführen ist (Nett, *et al.*, 2007). Zusammen mit der bereits unter normalen Umständen hohen Resistenz gegen einige Antimykotika, stellt *C. glabrata* daher ein zunehmend größer werdendes Problem in Kliniken dar.

1.2.2 Klinisches Bild

Von den über 150 bekannten *Candida*-Arten tritt nur ein kleiner Anteil als menschliches Pathogen in Erscheinung. Dies ist darauf zurück zu führen, dass zwei Drittel dieser Gattung nicht bei Temperaturen von 37 °C wachsen können und ihnen der menschliche Körper demnach nicht als Wirtsorganismus zur Verfügung steht (Odds, 1988, Casadevall, 2005). Medizinisch relevante Arten wie *C. albicans* oder *C. glabrata* können jedoch bei immunsupprimierten Menschen zu Candidosen führen, eine Sammelbezeichnung für Infektionskrankheiten durch Pilze der Gattung *Candida* (Pfaller & Diekema, 2007). Eine Immunsuppression kann zum Beispiel bei einer Infektion durch das humane Immundefizienzvirus (HIV) oder nach einer Chemotherapie, Organtransplantation oder anderen chirurgischen Eingriffen auftreten. Bei sehr alten Menschen und Frühgeborenen kann es aufgrund einer schwachen Immunabwehr ebenfalls leicht zu Candidosen kommen (Abbildung 5) (Sobel, 1988, Komshian, *et al.*, 1989, Chandra, *et al.*, 2001, Ramage, *et al.*, 2006).

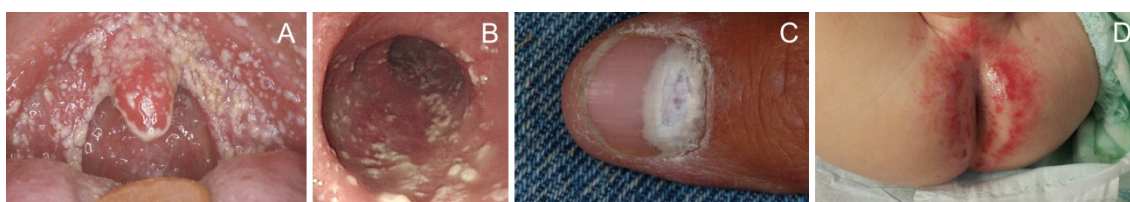


Abbildung 5: Manifestierte Infektionen mit *Candida* Spezies.

A) Orale Candidose (Quelle: http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/kiessling-cornelia-2005-04-28/HTML/kiessling_html_m2266fe43.jpg), B) Ösophageale Candidose (Quelle: http://www.endoatlas.org/assets/media/img/xl/weo_oesophageal_candidiasis_saun.jpg), C) Nagelpilz (Quelle: <http://www.online-artikel.de/article/nagelpilz-behandlung-was-man-alles-gegen-nagelpilz-machen-kann-35090-1.html>), D) Windeldermatitis (Quelle: http://paediatric-weiterbildung.de/wp-content/uploads/windeldermatitis_15.56.40.jpg).

Auch Behandlungen mit Breitbandantibiotika können Candidosen hervorrufen, da sie das Gleichgewicht der Standardflora stören und somit ein unkontrolliertes Wachstum verschiedener *Candida*-Spezies ermöglichen (Pfaller & Diekema, 2007). Mittlerweile

sind pilzliche Erreger mit steigender Tendenz an etwa 10 % aller nosokomialen Infektionen beteiligt (Edmond, *et al.*, 1999, Sandven, *et al.*, 2001), wobei 80 % dieser Infektionen auf Spezies der Gattung *Candida* zurückzuführen sind (Blumberg, *et al.*, 2001). Durch *Candida*-Spezies hervorgerufene invasive Mykosen werden als Candidämien bezeichnet und haben eine Mortalitätsrate von 30 – 35 % (Hajjeh, *et al.*, 2004, Tortorano, *et al.*, 2006). Als häufigster Verursacher einer Candidämie ist *C. albicans* zu nennen, welcher als einziger aller bekannten *Candida*-Arten den Menschen als primären Standort besitzt, und der je nach Land, Patientengruppe und zugrundeliegender Erkrankung aus etwa 50 % aller Infizierten isoliert werden kann. Allerdings werden auch nicht-*albicans*-Spezies wie *C. glabrata*, *C. parapsilosis* und *C. tropicalis* zunehmend als Erreger menschlicher Infektionen beobachtet, wobei *C. glabrata* der am häufigsten vorkommende Erreger ist und aus bis zu 24 % der infizierten Patienten isoliert wird (Krcmery, 1999, Tortorano, *et al.*, 2006). Zudem vermittelt *C. glabrata* eine überdurchschnittlich hohe Mortalitätsrate von 50 %, die sich unter anderem auf eine natürliche Resistenz gegen Antimykotika der Azol-Klasse zurückführen lässt (Zepelin, 2007). Dadurch erklärt sich, dass seit den 90er Jahren, aufgrund antimykotischer Behandlungen mit Azolen eine epidemiologische Verschiebung hin zu nicht-*albicans*-Spezies beobachtet wird. Die Identifikation möglicher Virulenzfaktoren zur Entwicklung neuer Antimykotika, besonders von *C. glabrata*, der in Deutschland für 19 % aller verzeichneten Candidämien verantwortlich ist, gewinnt dabei immer mehr an Bedeutung (Zepelin, 2007).

1.2.3 Virulenzfaktoren von *C. glabrata*

C. glabrata und *C. albicans* sind beide kommensalistisch lebende Humanpathogene, die sich in ähnlichen ökologischen Nischen ansiedeln, obwohl sich die beiden Organismen bereits vor langer Zeit evolutionär auseinander entwickelt haben (Kaur, *et al.*, 2005). Somit haben sie neben gemeinsamen Virulenzfaktoren auch unterschiedliche Strategien zur Besiedlung und Infektion des Menschen entwickelt, die lediglich im Fall von *C. albicans* bereits besser untersucht sind. Von *C. albicans* wird unter sauren Bedingung hauptsächlich Wachstum in Hefe-Form beobachtet wird, wohingegen basische Umgebungen Hyphenwachstum hervorrufen. Hyphen wird die Fähigkeit zugesprochen, Gewebe zu durchwachsen, was zu einem invasiven, disseminierten Befall des Wirtes führt (Lee, *et al.*, 1975, Buffo, *et al.*, 1984, Lo, *et al.*, 1997, Braun &

Johnson, 2000, Gow, *et al.*, 2003). Da *C. glabrata* nicht in der Lage ist Hyphen auszubilden, wird seine Pathogenität allein durch die Hefeform vermittelt. *C. albicans* kann verschiedene hydrolytische Enzyme, wie Aspartylproteasen oder Phospholipasen sezernieren, die eine wichtige Rolle bei der Gewebeinvasion spielen (Naglik, *et al.*, 2003). Aspartylproteasen können unterschiedliche Funktionen aufweisen, die am Abbau verschiedener Proteine der extrazellulären Matrix, sowie der Oberfläche der Schleimhaut beteiligt sind (Naglik, *et al.*, 2003, Naglik, *et al.*, 2004). *C. glabrata* exprimiert jedoch keine signifikanten Mengen solcher Aspartylproteasen. Die von *C. glabrata* exprimierten Proteasen scheinen lediglich an strukturellen Umbauprozessen beteiligt zu sein, die sich auf die Adhäsionsfähigkeit von *C. glabrata* auswirken (Kaur, *et al.*, 2005, Kaur, 2007). Phospholipasen, die Esterbindungen von Glycerophospholipiden in *C. albicans* hydrolysieren und somit zu einer Virulenzsteigerung führen, werden ebenfalls von *C. glabrata* produziert, jedoch im Vergleich zu *C. albicans* in deutlich geringeren Mengen (Ghannoum, 2000, Kantarcioglu & Yucel, 2002, Dolan, *et al.*, 2004).

Das bereits beschriebene phänotypische *Switching*, welches *C. glabrata* befähigt seine Koloniemorphologie zu ändern um sich möglicherweise schneller an neue Umgebungen anpassen zu können und der Immunantwort des Wirtes zu entfliehen, scheinen wiederum an der Kolonisierung verschiedener Organe beteiligt zu sein (Lachke, *et al.*, 2000, Lachke, *et al.*, 2002, Brockert, *et al.*, 2003). Die Fähigkeit zur Biofilmbildung ist ein weiterer Pathogenitätsfaktor von *C. glabrata*, da dem Organismus dadurch die Adhäsion an klinischen Instrumenten wie Kathetern und Prothesen ermöglicht wird, was den Befall innerer Organe und die Übertragung zwischen Patienten erleichtert (Wilson, *et al.*, 1993). Zudem bringt die Ausbildung von Biofilmen eine verringerte Sensitivität gegenüber Antimykotika mit sich, da die einzelnen Zellen im Biofilm für den Wirkstoff schlechter zugänglich sind (Douglas, 2002, Iraqui, *et al.*, 2005). Zuletzt ist die hohe natürliche Resistenz von *C. glabrata* gegen Antimykotika der Azol-Klasse zu nennen, welche maßgeblich zur größer werdenden klinischen Bedeutung dieses Pilzes beiträgt (Nguyen, *et al.*, 1996, Fidel, *et al.*, 1999).

1.2.4 Therapiemöglichkeiten von Candidosen

Eine Voraussetzung für wirksame Medikamente ist, dass sie für den Menschen verträglich sind. Die Entwicklung von Medikamenten gegen pilzliche Erreger wird

jedoch dadurch erschwert, dass sowohl Pilze und Menschen Eukaryoten sind. Da Pilze und Menschen ähnliche zelluläre Mechanismen besitzen, ist sicherzustellen, dass durch ein Medikament nur zelluläre Vorgänge in den Pilzzellen, nicht aber in menschlichen Zellen beeinflusst werden. Aus diesem Grund waren bis vor einem Jahrzehnt nur sieben Antimykotika zur Behandlung systemischer Pilzinfektionen erhältlich. Die Anzahl an Arzneimitteln gegen Candidosen hat aufgrund neuer wissenschaftlicher Erkenntnisse in den letzten Jahren aber zugenommen. Zu den vier Hauptgruppen von Antimykotika gehören Polyene, Nukleosid-Analoga, Azole und Echinocandine (Cowen & Steinbach, 2008, Nett, 2012).

Polyene sind die am längsten bekannte Klasse der Antimykotika. Es handelt sich bei ihnen um fettlösliche Stoffe, die Komplexe mit Ergosterol in der pilzlichen Zellwand eingehen können, und diese dadurch durchlässiger machen. Ergosterol ist ein Sterol, welches in der Plasmamembran von Pilzen vorkommt und dort zur Stabilisierung der Zellwand beiträgt und deren Fluidität und Permeabilität verringert. Problematisch ist jedoch, dass Polyene auch Sterole menschlicher Zellen binden können, was zu schweren Nebenwirkungen führen kann. Mittlerweile wurden verträglichere aber genauso effektive Antimykotika der Polyenklasse entwickelt, wie das liposomale Amphotericin B, trotzdem konnte das Problem von Nebenwirkungen nicht komplett umgangen werden (Odds, *et al.*, 2003, Moen, *et al.*, 2009).

Als nächste Klasse sind die Nukleosid-Analoga mit ihrem Hauptvertreter 5-Flucytosin zu nennen. Dieses wird in *Candida*-Zellen zu 5-Fluor-Uraciltriphosphat verstoffwechselt und führt durch den Einbau in die RNA zur Unterbrechung der Proteinbiosynthese, was eine Wachstumsbegrenzung zur Folge hat. Da Resistenzen beobachtet wurden und sich diese schnell auf die gesamte Population ausbreiten, werden Nukleosid Analoga meist in Kombination mit Polyenen oder Azolen verabreicht (Ghannoum, 1999, Morschhäuser, 2003).

Seit den 70er Jahren ist die antimykotische Wirkung von Azolen bekannt, welche sich zum heutigen Zeitpunkt als meist verwendete Arzneimittel gegen Pilze etabliert haben. Azole hemmen die Expression der C14-Demethylase, die durch das Gen *ERG11* kodiert wird. Dadurch wird die Umwandlung von Lanosterol in 14- α -Demethyl-Lanosterol unterbrochen, was neben der Zufuhrunterbrechung von Ergosterol zu einer Anhäufung an toxischen Stoffen im Zellinneren führt (Abbildung 6).

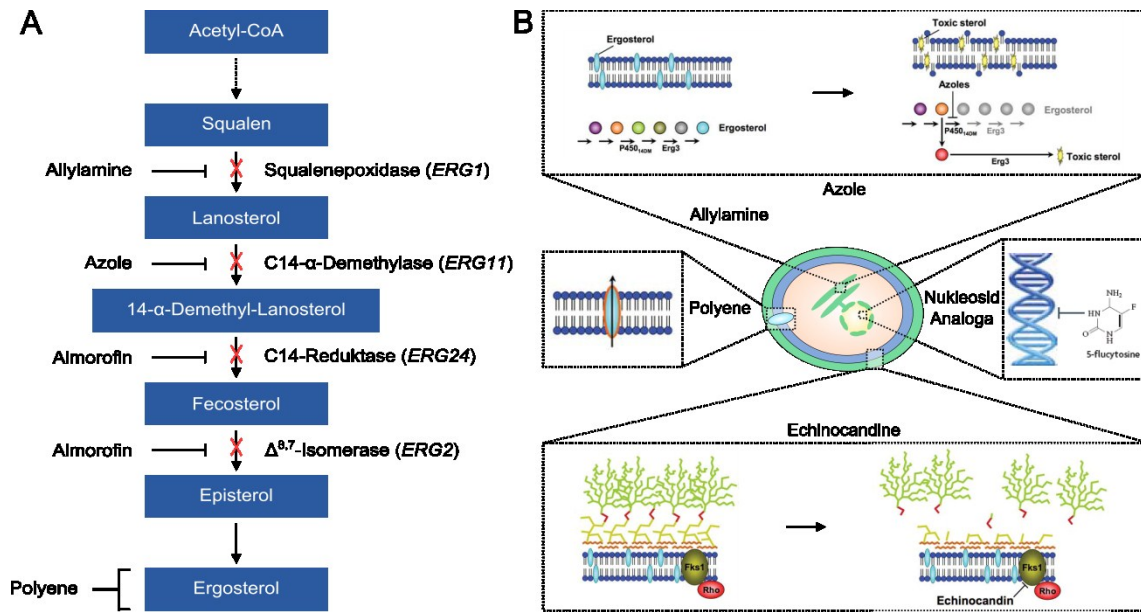


Abbildung 6: Ergosterol-Biosyntheseweg und Wirkungsmechanismen von Antimykotika.

A) Der Ergosterol-Biosyntheseweg und die Wirkungsmechanismen verschiedener Antimykotika modifiziert nach Lupetti *et al.*, 2002 und Onyewu *et al.* 2003. B) Ausgewählte Antimykotika und ihre Angriffsziele modifiziert nach Cowen und Steinbach, 2008. Azole und Allylamine unterbrechen die Biosynthese von Ergosterol im endoplasmatischen Retikulum. Als Folge entstehen toxische Zwischenprodukte, die in die Zellwand eingebaut werden. Polyene binden Ergosterol und bilden membrandurchspannende Kanäle aus, welche die Zellwand des Pilzes brüchig machen. Nucleosid Analoga unterbrechen die Transkription von Genen durch ihren Einbau in die RNA. Echinocandine inhibieren die Synthese von β -1,3-Glukan, dem Hauptbestandteil der pilzlichen Zellwand.

Obwohl Azole verträglicher als Polyene sind, können sie zu Leberschäden führen, indem sie Enzyme beeinflussen, die zum Cytochrom P450-System gehören und die wichtig für die Verstoffwechselung wasserunlöslicher Stoffe durch Oxidation sind (Lupetti, *et al.*, 2002, Guery, *et al.*, 2009, Pappas, *et al.*, 2009). Des Weiteren besitzt *C. glabrata* generell eine sehr geringe Empfindlichkeit und in einigen Fällen Resistenzen gegenüber Azolen (Willocks, *et al.*, 1991, Hitchcock, *et al.*, 1993, Tortorano, *et al.*, 2006). Solch resistente *C. glabrata* Stämme können dem inhibierend wirkenden Effekt von Azolen auf die C14- α -Demethylase häufig durch eine erhöhte Expression von *ERG11* entgegenwirken (Henry, *et al.*, 2000). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass der durch das Antimykotika entstehende Selektionsdruck zu einer Duplikation des Chromosoms führte, auf dem das *ERG11*-Gen lokalisiert ist (Moran, *et al.*, 1998). Bei weiteren Untersuchungen konnte jedoch beobachtet werden, dass das doppelte Chromosom auf azolfreiem Medium wieder verloren ging wodurch die Empfindlichkeit gegenüber Azolen wieder erhöht wird (Marichal, *et al.*, 1997, Polakova, *et al.*, 2009). Aufgrund der natürlichen Resistenz von *C. glabrata* gegen Azole, erklärt sich seine steigende klinische Relevanz, die durch die Entdeckung und

prophylaktische Gabe von Azolen hervorgerufen wurde. Zusätzlich zu einer erhöhten *ERG11* Expression konnte auch eine Überexpression bestimmter Membrantransporter, die zur *ATP-Binding Cassette*- (ABC) und *Major Faciliator*- (MF) Superfamilie gehören beobachtet werden. Diese Transporter sind am Transport von Azolen aus dem Zellinneren heraus beteiligt (Miyazaki, *et al.*, 1998, Sanglard, *et al.*, 1999, Sanglard, *et al.*, 2001, R., 2004, Ferrari, *et al.*, 2009).

Die zurzeit neuste Antimykotika-Klasse wird durch die Echinocandine repräsentiert. Diese Stoffklasse inhibiert die Synthese von β -1,3-Glukan, einem Bestandteil der pilzlichen Zellwand, indem sie die β -1,3-Glukan-Synthase hemmen. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass sich auch gegen diese Klasse der Antimykotika bereits Resistenzen entwickelt haben (Pfaller, *et al.*, 2003, Pfaller, *et al.*, 2003, Ruhnke, *et al.*, 2008, Walker, *et al.*, 2010).

Aus den genannten Gründen ist es von besonderem Interesse neue pilzliche Strukturen zu identifizieren, welche einen Einfluss auf die Pathogenität von *C. glabrata* haben und somit Ziele für die Entwicklung neuer Medikamente sein könnten. Ein besonderes Interesse gilt hierbei der Untersuchung von pilzlichen Adhäsinen, wie beispielsweise der großen *EPA*-Familie aus *C. glabrata*. Die bis zu 23 Proteine dieser Familie ermöglichen die Anhaftung an Wirtszellen und tragen daher in hohem Maße zur Kolonisierung und Infektion des Menschen bei (Cormack, *et al.*, 1999, de Groot, *et al.*, 2008).

1.3 Pilzliche Adhäsine

1.3.1 Die Zellwand und Zellwandproteine von *Saccharomyceten*

Die Zellwand von *Saccharomyceten* ist als äußerst gelegene Schicht an den verschiedensten Vorgängen beteiligt. Sie dient dem Schutz vor äußeren Einflüssen, spielt eine Rolle bei der Aufnahme von Substanzen aus der Umgebung und ist in morphologische Umbauprozesse involviert. Zudem sind Zellwandproteine an der Kolonisierung des Wirtsorganismus beteiligt, indem sie zur Anhaftung und Invasion des Wirtsgewebes beitragen (de Groot, *et al.*, 2004, Pardini, *et al.*, 2006, Tumbarello, *et al.*, 2007). Da die Zellwand von pilz-spezifischen Enzymen gebildet wird, besitzt sie Komponenten, die im Menschen nicht zu finden sind, zudem trägt sie entscheidend zur

Interaktion zwischen Pathogen und Wirt bei, was sie für die Arzneimittelentwicklung sehr interessant macht. Die meisten Informationen über die Struktur und Zusammensetzung der Zellwand von *Saccharomyceten* sind aus Untersuchungen von *S. cerevisiae* und *C. albicans* bekannt, über die Zellwandeigenschaften von *C. glabrata* ist hingegen vergleichsweise wenig bekannt. Die Hauptkomponenten der Zellwand aller drei Organismen sind Chitin (Poly-GlcNAc- β -1,4-GlcNAc), β -1,3-Glukan, β -1,6-Glukan und hoch mannosylierte Proteine (Abbildung 7) (De Nobel, *et al.*, 1991, Popolo, *et al.*, 1997, Chaffin, *et al.*, 1998, Osumi, 1998, Frieman, *et al.*, 2002, Aguilar-Uscanga & Francois, 2003, Weig, *et al.*, 2004, Klis, *et al.*, 2006, Pardini, *et al.*, 2006, Ruiz-Herrera, *et al.*, 2006, Cabib, *et al.*, 2007, de Groot, *et al.*, 2008, Gonzalez, 2009).

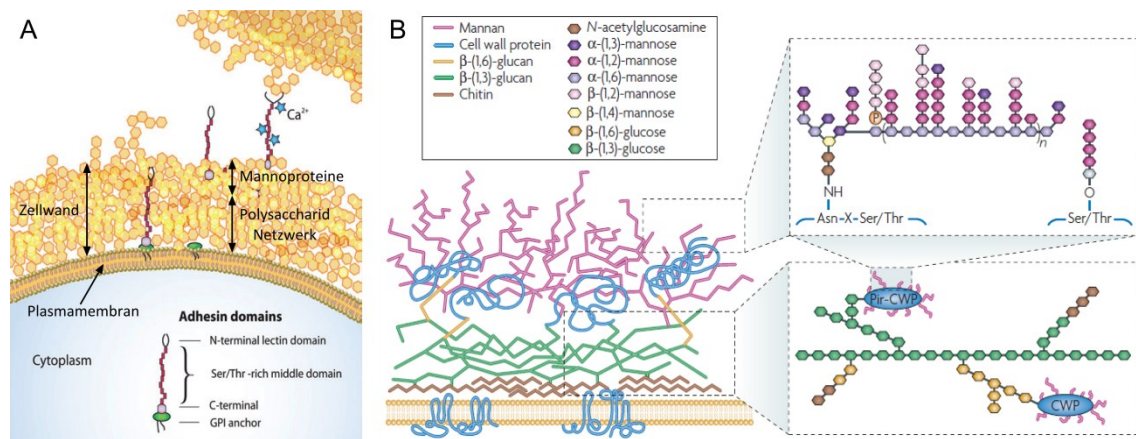


Abbildung 7: Die pilzliche Zellwand.

A) Aufbau der Zellwand, sowie schematische Darstellung der Sekretion und Verankerung von GPI-Proteinen in die Zellwand (Verstrepen & Klis, 2006). B) Die Struktur der Zellwand am Beispiel von *C. albicans* (Netea, *et al.*, 2008). Der Plasmamembran folgt eine dünne Chitinschicht (braun), auf die eine Schicht aus β -1,3-Glukanen (grün) folgt. Über β -1,6-Glukane (gelb) sind Membranproteine (blau) in die Zellwand verknüpft. Die Membranproteine sind hoch mannosyliert (rosa/magenta/violett).

Die innerste Chitinschicht bedeckt die Plasmamembran, ihr Trockengewichtsanteil kann je nach Art leicht variieren und liegt zwischen 1 und 5 % (Fleet, 1985, Brown, 1992, Weig, *et al.*, 2004). Auf die Chitinschicht folgt eine Schicht aus β -1,3-Glukanen, welche den größten Glykananteil der Zellwand bilden. Die β -1,3-Glukane binden kovalent über ihre nicht-reduzierten Enden an das Chitin und nach außen hin an stark verzweigte β -1,6-Glukane (Kapteyn, *et al.*, 1997). Die innere Schicht, die sich aus Chitin und β -verzweigten-Glukanen zusammensetzt ist maßgeblich für die mechanische Stabilität der Zellen verantwortlich und bildet mit einem Trockengewichtsanteil von 45 - 60 % den größten Teil der zellwandbildenden Glykanstrukturen (Smith, *et al.*, 2000, Klis, *et al.*, 2002). Zudem bildet sie die Anknüpfstelle für die verzweigten und

hochmannosylierten Zellwandproteine, welche die äußere Schicht bilden. Die Proteine der äußeren Schicht sind meist an die Schicht aus β -1,6-Glukanen geknüpft oder binden direkt an die β -1,3-Glukane (Kapteyn, *et al.*, 1997) und machen einen Trockengewichtsanteil von 35 – 40 % aus. Die äußere Schicht vermittelt Oberflächeneigenschaften wie Hydrophobizität, elektrische Ladung, Agglutination und Adhäsion, zudem schützt sie die innere Zellschicht vor zellwandabbauenden Enzymen (Lipke & Kurjan, 1992, Cappellaro, *et al.*, 1994, Reynolds & Fink, 2001). Aus aktuellen Studien ist bekannt, dass *Candida*-Spezies einen etwa doppelt so hohen Anteil an Zellwandproteinen wie die Bäckerhefe aufweisen, was sich in einem erhöhten Mannosidanteil der Zellwand widerspiegelt. Eine wichtige Klasse dieser Zellwandproteine stellen die Glykosyl-Phosphatidylinositol (GPI)-verankerten Zellwandproteine (CWP) dar, von denen mittels genomweiter *in silico* Analysen 66, 104 und 106 mutmaßliche Vertreter in den Genomen von *S. cerevisiae*, *C. albicans* und *C. glabrata* identifiziert werden konnten (de Groot, *et al.*, 2003, Weig, *et al.*, 2004, de Groot, *et al.*, 2008). Dabei repräsentieren die Flokkuline, die Agglutinin-ähnlichen (Als)-Proteine und Epa-Proteine große Proteinfamilien der jeweiligen Organismen, die im Fall von *C. albicans* und *C. glabrata* durch Vermittlung von Adhäsion zur Kolonisierung des Wirts beitragen (Kaur, *et al.*, 2005).

1.3.2 Adhäsi

Adhäsi spielen eine wichtige Rolle in Hefepilzen, weil sie an Vorgängen wie der sexuellen Fortpflanzung, sowie an vegetativen Adhäsionsprozessen beteiligt sind. Hierzu zählen neben Zell-Zell Adhäsion auch das Anhaften an verschiedenste Oberflächen, weshalb Adhäsi im Falle von *C. albicans* und *C. glabrata* einen entscheidenden Beitrag zur Pathogenität liefern (Guo, *et al.*, 2000, Verstrepen, *et al.*, 2004, Xie & Lipke, 2010, Brückner & Mösch, 2012). Die Flokkuline, Als-Proteine und Epa-Proteine zählen alle zu den GPI-verankerten Zellwandproteinen, vermitteln vegetative Adhäsion und besitzen alle eine ähnliche Grundstruktur, die drei Domänen (A, B und C), eine N-terminale Signalsequenz und einer C-terminale hydrophobe Sequenz umfasst (Abbildung 8) (Hoyer, *et al.*, 1998, Verstrepen, *et al.*, 2004, de Groot & Klis, 2008). Die N-terminale A-Domäne ist als eigentliche Adhäsions-Domäne für die spezifische Bindung verschiedener Liganden verantwortlich. Je nach gebundenem Ligand können die Adhäsi in zwei Gruppen eingeteilt werden, wobei eine

Unterscheidung in Glykan-insensitive Adhäsine oder Glykan-sensitive Adhäsine (Lektine) erfolgt (Verstrepen & Klis, 2006). Die erste Gruppe, zu der die Als-Proteine gehören, ist zur Bindung bestimmter Proteine befähigt (Salgado, *et al.*, 2011). Die zweite Gruppe, zu der einige Vertreter der Flokkuline, sowie die Epa-Proteine gehören, ist in der Lage verschiedene Glykane zu binden (Frieman, *et al.*, 2002, Veelders, *et al.*, 2010, Maestre-Reyna, *et al.*, 2012).

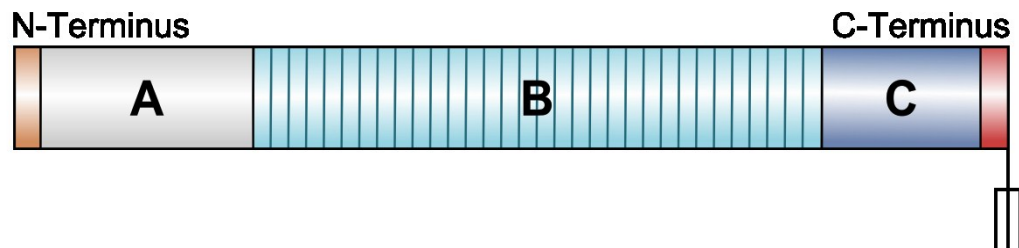


Abbildung 8: Grundstruktur der GPI-verankerten Zellwandproteine.

Domänenstruktur der Adhäsine aus *S. cerevisiae*, *C. albicans* und *C. glabrata*. Am N-Terminus befindet sich eine Signalsequenz, die für den Transport zur Plasmamembran benötigt wird. Dieser folgt die A-Domäne, welche die adhäsiven Eigenschaften vermittelt. Die B-Domäne besteht aus serin- und threoninreichen, repetitiven Sequenzen und sorgt für die Präsentation der A-Domäne außerhalb der Zellwand. Die C-Domäne, die eine Bindungsstelle für einen GPI-Anker enthält, verknüpft das Adhäsins mit der Zellwand (Verstrepen, *et al.*, 2004).

Die erste Gruppe, zu der die Als-Proteine gehören, ist zur Bindung bestimmter Proteine befähigt (Salgado, *et al.*, 2011). Die zweite Gruppe, zu der einige Vertreter der Flokkuline, sowie die Epa-Proteine gehören, ist in der Lage verschiedene Glykane zu binden (Frieman, *et al.*, 2002, Veelders, *et al.*, 2010, Maestre-Reyna, *et al.*, 2012). Die B-Domäne besteht aus serin- und threoninreichen, repetitiven Sequenzen, welche N- und O-glykosyliert sind. Wahrscheinlich weist die B-Domäne durch Koordination von Calciumionen eine stabile, stabähnliche Konformation auf, die es ihr ermöglicht die A-Domäne auf Zelloberflächen zu präsentieren (de Groot & Klis, 2008). Die C-terminale C-Domäne trägt einen GPI-Anker, der teilweise für die Verankerung der Adhäsine in die Zellwand verantwortlich ist (van der Vaart, *et al.*, 1996). Über den Sekretionsweg müssen die Proteine jedoch zunächst an die Plasmamembran transportiert werden, wobei sie im Endoplasmatischen Retikulum (ER) und im Golgi-Apparat posttranslational modifiziert werden. Während sie das ER passieren, werden sowohl die Signal-Sequenz als auch die C-terminale hydrophobe Sequenz abgespalten, die daraufhin durch einen GPI-Anker ersetzt wird (Udenfriend & Kodukula, 1995, de Groot, *et al.*, 2003). Der an die C-Domäne gebundene GPI-Anker sorgt anschließend für die Verankerung der Adhäsine in die Plasmamembran und wird

nach weiteren Prozessierungen größtenteils abgespalten. Der verbleibende Rest sorgt für eine kovalente Verknüpfung in der Zellwandschicht aus β -1,6-Glykanen (Kapteyn, *et al.*, 1999, Verstrepen & Klis, 2006).

1.3.3 Die *EPA*-Familie von *C. glabrata*

Das Genom des *C. glabrata* Stammes CBS138, welcher in dieser Arbeit verwendet wurde, kodiert für 66 mutmaßliche GPI-verankerte Adhäsine, wovon 17 zur *EPA*-Familie gehören (Dujon, *et al.*, 2004, de Groot, *et al.*, 2008). Im *C. glabrata* Stamm BG2 konnten sogar 23 Mitglieder dieser Gruppe identifiziert werden (Kaur, *et al.*, 2005). Von den 66 mutmaßlichen Adhäsingenen des *C. glabrata* Stammes CBS138 sind 44 in subtelomeren Regionen lokalisiert. Dies trifft mit Ausnahme von *EPA8*, *EPA9* und *EPA10* auch für alle *EPA*-Gene des CBS138 Stammes zu (Abbildung 9) (de Groot, *et al.*, 2008). Es wird vermutet, dass die Regulation der Expression verschiedener *EPA*-Gene in Abhängigkeit von äußeren Einflüssen durch transkriptionelles *Silencing* ermöglicht wird und dadurch je nach Kolonisierungsort ein passendes Set an Epa-Proteinen hergestellt wird (De Las Penas, *et al.*, 2003, Castano, *et al.*, 2005, de Groot, *et al.*, 2008). Das transkriptionelle *Silencing* von einem Großteil der *EPA*-Gene wird durch die NAD^+ -abhängige Histondeacetylase Sir2 und einem Proteinkomplex aus Sir3 und Sir4 reguliert (De Las Penas, *et al.*, 2003, Domergue, *et al.*, 2005, Iraqui, *et al.*, 2005). Sir2 übernimmt dabei als NAD^+ -abhängige Histondeacetylase die katalytische Funktion, wobei die Expression der jeweiligen Gene über die Verpackung in Heterochromatin reprimiert wird. NAD^+ ist dabei ein essentieller Cofaktor für Sir2 und bindet als Akzeptor Acetylgruppen der Histone H3 und H4, was zu einer Komprimierung des Chromatins führt und in Folge die Transkription der *EPA*-Gene inhibiert (Tanny & Moazed, 2001). Ein Vorläufer von NAD^+ stellt Nikotinsäure dar, für die *C. glabrata* auxotroph und daher auf eine Versorgung über den Wirt angewiesen ist. Liegt ein Nikotinsäure-Mangel vor, wird das Sir-abhängige transkriptionelle *silencing* verhindert, sodass die Expression von spezifischen *EPA*-Genen gewährleistet ist. So lassen sich Harnwegsinfektionen mit *C. glabrata* beispielsweise auf die Expression von Epa6 zurückführen, dessen Transkription durch den vorherrschenden Nikotinsäure-Mangel nicht mehr reprimiert wird. Aber auch Proteine wie Rif1, Ku70 und Ku80, welche die Länge der Telomere kontrollieren, und Rap1, welches an telomeren Wiederholungen bindet und in der Lage ist Sir2 zu den Telomeren zu



Genomische Organisation von membranösen GPI-verankerten Adhäsinen, die im Genom des *C. glabrata* Stamm CBS138 kodiert sind. Die *EPA*-Gene (in Rot hervorgehoben) sind fast ausschließlich subtelomer lokalisiert (de Groot, *et al.*, 2008).

Des Weiteren wird die *EPA6*-Expression durch Transkriptionfaktoren aktiviert, die ortholog zu Flo8 und Mss11 aus *S. cerevisiae* sind und dort interessanterweise an der Expression der, mit der *EPA*-Familie verwandten, *FLO*-Gene beteiligt sind (Mundy & Cormack, 2009). Weiterhin ist bekannt, dass die Flo8- und Mss1-abhängige Aktivierung des *EPA6*-Promotors ebenfalls durch bestimmte Inhaltsstoffe in Konservierungsmitteln, Hygieneprodukten oder Fungiziden, die zur Behandlung von vaginalen Pilzinfektionen eingesetzt werden, positiv beeinflusst werden kann. Beispiele für diese Inhaltsstoffe sind Methylparaben und Propylparaben, beides Konservierungsmittel in Shampoos, Duschgels und anderen Kosmetika oder Sorbinsäure, ein Konservierungsmittel in bestimmten Lebensmitteln (Mundy & Cormack, 2009). Auch die Bildung von

Biofilmen beruht auf der Aktivierung einiger *EPA*-Gene durch die Proteinkinase Yak1 (Iraqi, *et al.*, 2005). Der komplexe Regulationsmechanismus der *EPA*-Gene, der bisher jedoch nur unvollständig geklärt ist, sorgt vermutlich für eine optimale Präsentation verschiedener Epa-Proteine an der Oberfläche von *C. glabrata*, wodurch die Kolonisierung der variierenden Wirtsumgebung ermöglicht wird. So vermittelt Epa1 unter Laborbedingungen 95 % der Adhäsion an menschliche HEp-2 Epithelzellen. Bei *in vivo* Untersuchungen konnte durch Deletion von *EPA1* jedoch keine verringerte Infektionsfähigkeit der Schleimhäute von Mäusen beobachtet werden, weshalb davon ausgegangen wird, dass andere Epa-Proteine den Verlust von Epa1 kompensieren (Cormack, *et al.*, 1999). Bei der Deletion der Gene *EPA1* bis *EPA5* kann hingegen eine leichte Abschwächung der Adhäsion beobachtet werden und gemeinsame Deletion von *EPA1*, *EPA6* und *EPA7* führt sogar zu einem Adhäsionsverlust. Daher wird vermutet, dass der Verlust mehrerer Epa-Proteine mit ähnlicher Ligandenspezifität nicht mehr durch andere kompensiert werden kann (De Las Penas, *et al.*, 2003, Domergue, *et al.*, 2005).

Zu Beginn dieser Arbeit war bekannt, dass Epa-Proteine aus *C. glabrata* an der Kolonisierung des Wirtsorganismus beteiligt sind. Dabei wird vermutet, dass sie eine spezifische Ligandenbindung vermitteln und sich die Besiedlung verschiedener Gewebstypen auf jeweils spezialisierte Epa-Proteine zurückführen lässt. Da die A-Domäne von GPI-verankerten Zellwandproteinen als funktionelle Domäne betrachtet wird, welche die Adhäsion vermittelt, ist es von hohem Interesse diese genauer zu untersuchen, um Aussagen über die Bindungsspezifität und -affinität treffen zu können. Durch genaue Kenntnis der Substratspezifität, wäre man zum Beispiel in der Lage, gezielt Liganden zu synthetisieren, deren Gabe möglicherweise die Kolonisierung des Wirts vermindert. Dies wäre von großem Interesse für die Arzneimittelindustrie, da man so in der Lage wäre, die Kolonisierung des Wirts zu unterdrücken ohne starke Nebenwirkungen im Menschen oder Resistenzen im Pilz hervorzurufen.

1.3.4 Die A-Domäne der Epa-Proteine

Die N-terminalen A-Domänen GPI-verankerter Adhäsine und Epa-Proteine spielen eine entscheidende Rolle bei der Kolonisierung des Wirtsorganismus, da sie jeweils spezifische Liganden binden und dadurch Adhäsion, zum Beispiel an Epithelzellen vermitteln. Durch vorangegangene Arbeiten sind bereits die Strukturen der A-Domänen

von Flo5 aus *S. cerevisiae*, Als9 aus *C. albicans* und Epa1 aus *C. glabrata* bekannt (Abbildung 10) (Veelders, *et al.*, 2010, Salgado, *et al.*, 2011, Maestre-Reyna, *et al.*, 2012).

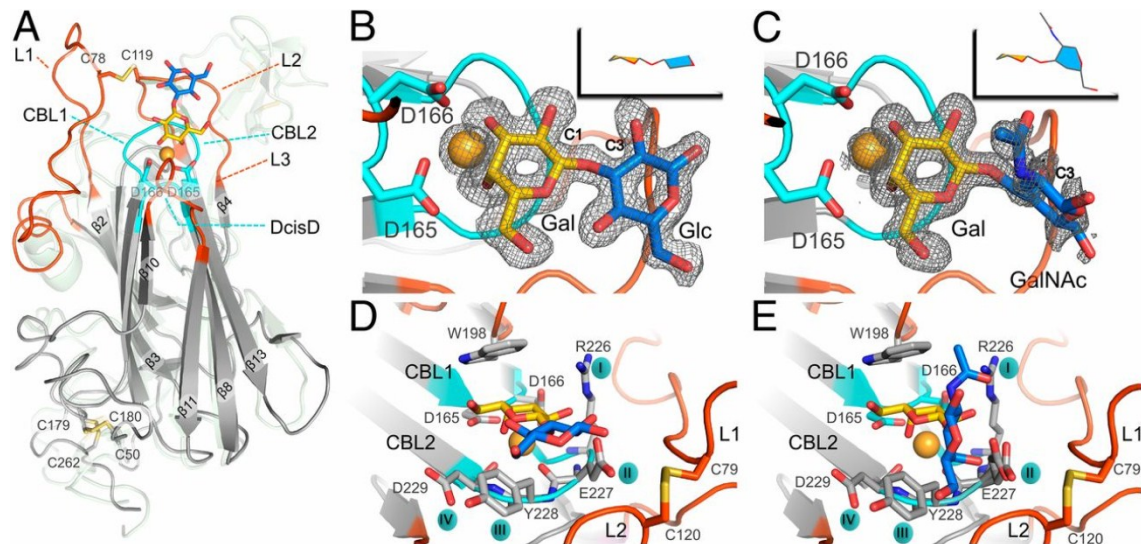


Abbildung 10: Struktur der A-Domäne von Epa1.

A) Struktur der Epa1A-Domäne (grau) co-kristallisiert mit Galβ1-3Glc (Galactose: Gelb; Glukose: blau). CBL1 und CBL2 (cyan) komplexieren ein Calciumion (orange). L1, L2 und L3 gehören zur Bindungstasche und schützen gebundene Liganden vor Solvenseinflüssen. Zudem vermitteln sie zusammen mit Resten der CBL2-Region die Ligandenspezifität. Die Struktur der Flo5A-Domäne ist in einem transparentem Grün mit der Epa1A-Domäne überlagert. Die Bindungstasche der Epa1A-Domäne co-kristallisiert mit: B+D) Galβ1-3Glc und C+E) T-Antigen als Ligand (Maestre-Reyna, *et al.*, 2012).

Bei den A-Domänen von Flo5 und Epa1 handelt es sich um Glykan-sensitive Lektine, wohingegen Als9 über die Fähigkeit verfügt, Zellwandproteine der Wirtszelle zu binden. Im Gegensatz zu den A-Domänen der Adhäsine aus *C. albicans*, weisen die A-Domänen von Flo5 und Epa1, als auch die von Flo1, Flo9 und Flo10 aus *S. cerevisiae* und alle anderen EpaA-Domänen aus *C. glabrata* eine PA14-Domäne auf (de Groot & Klis, 2008, Desai, *et al.*, 2011). Die Struktur der PA14-Domäne aus *Bacillus anthracis* wurde 1997 gelöst (Petosa, *et al.*, 1997). Sie ist Teil des protektiven Antigens (PA) des Anthrax-Toxins und ihr Name leitet sich von ihrem Molekulargewicht von 14 kDa ab. Das strukturelle Charakteristikum von PA14-Domänen ist ein sogenanntes β-Sandwich, welches sich aus antiparallel angeordneten β-Faltblättern zusammensetzt. Solche β-Sandwich-Strukturen konnten bereits in vielen bakteriellen und eukaryotischen Proteinen, wie bakteriellen Toxinen, Signal-Molekülen und Adhäsinen verschiedener Hefe-Arten gefunden werden (Rigden, *et al.*, 2004, Kolbinger, *et al.*, 2005, Nusbaum, *et al.*, 2006, Scherer, *et al.*, 2006, Yoshida, *et al.*, 2010, Larsbrink, *et al.*, 2011). Neben der PA14-Domäne zeichnen sich

Flo5 und Epa1 durch eine ungewöhnliche *cis*-Peptidbindung zwischen zwei Asparaginsäuren aus (Veelders, *et al.*, 2010, Maestre-Reyna, *et al.*, 2012). Dieses sogenannte *DcisD*-Motiv ist an der Ligandenbindung beteiligt und gilt neben der PA14-Domäne als weiteres charakteristisches Merkmal der 2010 postulierten PA14/Flo5-ähnlichen Familie. Die weiteren Epa-Proteine werden wahrscheinlich auch der PA14/Flo5 ähnlichen Familie zugeordnet, da die beiden Asparaginsäuren innerhalb der Epa-Familie konserviert sind.

Die A-Domäne von Epa1 ist aus 15 β -Faltblattsträngen aufgebaut, von denen 11 eine spezielle Variante der PA14-Domäne bilden (Abbildung 10). Die 15 β -Faltblattstränge sind durch hypervariable Bereiche getrennt, von denen fünf die eigentliche Bindungstasche ausbilden und somit zur Ligandenbindung als auch zur Spezifitätsvermittlung beitragen. Dabei tragen die beiden kürzeren, innen gelegenen Loops CBL1 und CBL2 (*calcium binding loop*) zur Komplexierung eines Calciumions sowie zur Ligandenspezifität bei. Die drei längeren, äußeren Loops L1, L2 und L3 tragen aller Voraussicht nach ebenfalls zur Ligandenerkennung und zum Schutz vor Solvens-Einflüssen bei. CBL1 verknüpft die beiden β -Faltblattstränge 8 und 9 miteinander und enthält das *DcisD*-Motiv, wohingegen CBL2 die β -Faltblattstränge 12 und 13 miteinander verknüpft. Durch die Carboxyl-Gruppen des *DcisD*-Motivs, die Seitenkette des Asparagin N225, sowie Carbonyl-Gruppen der Peptidbindungen des CBL2 erfolgt die Komplexierung eines Calciumions. Dieses ist essentiell für die Glykan-Bindung und interagiert mit den nicht reduzierten 3' und 4'-Hydroxylgruppen einer terminal gelegenen Galactose. Innerhalb der Bindungstasche erfolgt noch die Unterscheidung zweier Bindungsstellen. Die Innere setzt sich aus dem Calciumion, dem *DcisD*-Motiv, dem Arginin R226 des CBL2 und dem Tryptophan W198 des L3 zusammen und vermittelt eine spezifische Bindung von terminalen Galactose-Resten im Inneren der Bindungstasche. Dabei erfolgt eine Stabilisierung der Seitenkette des R226 mit den 2' und 3'-Hydroxylgruppen der Galactoseinheit, welche zudem durch hydrophobe Wechselwirkungen mit dem parallel gelegenen Tryptophanrest des L3 stabilisiert wird. Die äußere Bindungsstelle setzt sich aus den Seitenketten des CBL2 sowie den drei Loops L1, L2 und L3 zusammen, sie interagiert mit der Hexose, die auf die terminale Galactose Einheit folgt. L1 gehört nicht zur eigentlichen PA14/Flo5-ähnlichen Familie, ist aber mit L2 über eine Disulfidbrücke zwischen C78 und C119 verknüpft was zu einer Fixierung der beiden Loops führt. Dadurch schirmen

sie die Bindungstasche vor Solvens-Einflüssen ab und können ebenfalls an der Spezifitätsvermittlung der, auf die Galactose folgenden Glykanreste beteiligt sein. Um die Spezifitätsvermittlung von L1 und L2 noch besser verstehen zu können, ist die Untersuchung weiterer EpaA-Domänen von hohem Interesse. Dass die CBL2-Region nicht alleine für die Ligandenspezifität verantwortlich ist, zeichnet sich schon aus bekannten Glykan-Bindungsprofilen der A-Domänen von Epa1, Epa6 und Epa7 ab (Abbildung 11) (Zupancic, *et al.*, 2008).

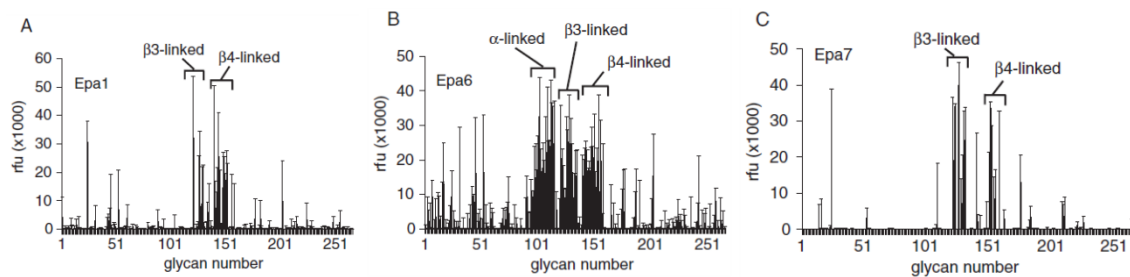


Abbildung 11: Glykan-Bindungsprofile der A-Domänen von Epa1, Epa6 und Epa7.

Die Glykan-Bindungsprofile wurden unter Verwendung von *S. cerevisiae* Zellen erhalten, welche die A-Domänen der verschiedenen Epa-Proteine auf ihrer Oberfläche präsentieren. Die einzelnen Signalpeaks zeigen welche Glykane (glycan number) gebunden wurden. Die Signalstärke wird als Fluoreszenzintensität (rfu) angegeben. Cluster mit α -, β 3- oder β 4-verknüpften terminalen Galactosiden sind hervorgehoben (Zupancic, *et al.*, 2008).

Hierbei bindet die A-Domäne von Epa6 terminale Galactoside, die sowohl α und β , als auch 1-3 und 1-4 mit Glucose, Galactose oder N-Acetylierten Derivaten der beiden Glykan verknüpft sind. Die A-Domäne von Epa1 hingegen bindet Galactoside die α verknüpft sind nur sehr schwach, und die A-Domäne von Epa7 zeigt trotz der gleichen CBL2-Region wie Epa1 nur eine sehr ausgeprägte Bindungsspezifität zu Galactosiden mit einer β 1-3 Verknüpfung zu weiteren Galactoseeinheiten.

Unter *in vivo* Bedingungen binden die Epa-Proteine von *C. glabrata* an menschliche Epithelzellen, und ermöglichen somit eine Kolonisierung des Wirtes (Cormack & Falkow, 1999). Epithelzellen bedecken die komplette menschliche Oberfläche und auch alle Hohlorgane, zu denen unter anderem der komplette Verdauungsapparat zählt. Auch die Zellen, welche die Blutbahn auskleiden, zählen zu den Epithelzellen und werden als Endothel bezeichnet. Alle menschlichen Zellen sind von einer Plasmamembran umgeben, die durch eine Lipiddoppelschicht gekennzeichnet ist, in welche verschiedene Membranproteine eingelagert sind. Periphere Membranproteine sind über GPI-Anker mit der Lipiddoppelschicht verknüpft. Des Weiteren sind alle Lipide und Membranproteine mit Glykanketten verknüpft, die zum Äußeren der Zelle gerichtet

sind. Zusammen genommen bilden die verschiedenen Glykoproteine, Glykolipide und Proteoglykane die sogenannte Glykokalix, welche die Zellen komplett umhüllt. Mucine sind als hoch glykosylierte Proteine ebenfalls ein Bestandteil der Glykokalix, und können aufgrund hoher Wassereinlagerungen eine Schleimschicht bilden, die als Mucosa bezeichnet wird und die menschlichen Epithelzellen vor äußeren Einflüssen schützt (Nieuw Amerongen, 1998, Hattrup & Gendler, 2008). Bis zum heutigen Zeitpunkt konnten circa 20 verschiedene menschliche Mucin-Gene identifiziert werden, deren Variabilität sich durch verschiedene Splicing- und Glykosylierungsvarianten erhöht (Hattrup & Gendler, 2008). Neben dem Schutz der Zellen vermitteln die membrangebundenen Mucine die Weiterleitung zellulärer Signale und Zell-Zell-Adhäsion, jedoch sind sie auch ein Angriffsziel für verschiedene Pathogene, zu denen auch *C. glabrata* zählt (Lagow, *et al.*, 1999, Schroeder, *et al.*, 2001, Knowles, 2002, Filler, 2006). Der humanpathogene Pilz ist mit seiner Vielzahl an Adhäsinen, zu denen auch die große Epa-Familie gehört, in der Lage die glykosylierten Mucine zu erkennen und an deren Glykanseitenketten zu binden. Da Mucine in Abhängigkeit von der Gewebsregion in der sie lokalisiert sind verschiedene Glykosylierungsmuster aufweisen und auch *C. glabrata* in Abhängigkeit von seiner Umgebung, nur einen Teil seiner Adhäsine exprimiert, ist es von bedeutendem Interesse mehr über die Bindungsspezifitäten der verschiedenen Epa-Proteine zu erfahren (Gipson, *et al.*, 1997, Bartman, *et al.*, 1998, Castano, *et al.*, 2005, Domergue, *et al.*, 2005, Russo, *et al.*, 2006, Sheehan, *et al.*, 2006). Dieses Verständnis könnte die Entwicklung von Antimykotika vorantreiben, welche die Bindung von *C. glabrata* an Zellen des Wirts inhibieren, und dabei keine Nebenwirkungen durch den Angriff menschlicher Zellen hervorrufen.

1.4 Zielsetzung

Zum heutigen Zeitpunkt ist *C. glabrata* für 15 % aller *Candida*-Infektionen verantwortlich und damit der zweithäufigste Erreger pilzlicher Infektionen nach *C. albicans*. *C. glabrata* ist nicht in der Lage Hyphen auszubilden, und *in vitro* beobachtete Pseudohyphen konnten bis zum heutigen Zeitpunkt noch nicht aus klinischen Proben isoliert werden. Auch die Produktion von Proteinasen und Phospholipasen scheint keinen Einfluss auf die Pathogenität von *C. glabrata* zu haben. Demnach liegt ein hohes Augenmerk auf Adhäsinen, welche zu den Pathogenitätsfaktoren von *C. albicans* gehören und die dem Pilz die Besiedlung des

Wirts ermöglichen. Zu diesen Adhäsinen zählt die in dieser Arbeit untersuchte Epa-Familie, die aus bis zu 23 Mitgliedern besteht. Bei einer so hohen Anzahl verschiedener Mitglieder dieser Multigen-Familie, kommt die Frage auf, ob und wie sich diese in ihrem Bindungsverhalten unterscheiden.

Ziel dieser Arbeit war es, das Verständnis des Mechanismus der Zell-Oberflächen Interaktion der Epa-Familie von *C. glabrata* zu vertiefen, um Rückschlüsse auf die Kolonisierung des Wirtes zu treffen. Da der N-terminalen A-Domäne die Funktionsvermittlung zugeschrieben wird, sollten alle 17 EpaA-Domänen des *C. glabrata* Stramms CBS138 in *E. coli* heterolog hergestellt und anschließend biochemisch charakterisiert werden. Hierzu sollen zunächst Bindungsspezifitätsprofile zu einer Vielzahl putativer Liganden gemessen werden, um mögliche Spezifitätsunterschiede zu ermitteln. Anschließend sollten Bindungsstärken zu ausgewählten Substratliganden ermittelt werden. In einem letzten Schritt sollten einzelne EpaA-Domänen strukturell untersucht werden. Die ermittelten Daten ermöglichen neben dem Verständnis der Bindungsvermittlung Aussagen über mögliche Spezifitätsunterschiede. Des Weiteren sollte mittels *S. cerevisiae* als Modellorganismus die Adhäsion an natürliche Substrate, wie menschliche Epithelzellen und abiotische Oberflächen untersucht werden.

2 Ergebnisse

2.1 Bioinformatische Analyse der EpaA-Domänen

Da in dieser Arbeit die N-terminale Ligandenbindungsdomäne der Epa-Proteine isoliert untersucht werden sollte, galt es zunächst die präzisen Grenzen der A-Domänen zu bestimmen. Insbesondere musste darauf geachtet werden, dass bei der Herstellung der Proteine weder das Sekretionssignal noch Teile der B-Domäne mit exprimiert werden. Andererseits musste berücksichtigt werden, dass keine für die Ligandenbindung benötigten Regionen bei der Konstruktion der Expressionsplasmide abgeschnitten werden. Daher wurden zunächst verschiedene bioinformatische Untersuchungen der einzelnen Epa-Proteinsequenzen durchgeführt, um die Löslichkeit der A-Domänen bei der nachfolgenden heterologen Expression zu optimieren.

Die N-terminalen Grenzen der verschiedenen EpaA-Domänen konnten mit Hilfe des *Signal IP 3.0* Servers bestimmt werden, einem Online-Service-Programm, das anhand der Primärsequenz eines Proteins die Anwesenheit und Lokalisierung von Sekretionssignalen voraussagt (Bendtsen, *et al.*, 2004). Die C-terminale Grenze der A-Domänen wurde durch die Analyse repetitiver Bereiche, die charakteristisch für die verschiedenen B-Domänen sind und bereits in der Primärsequenz des Proteins ersichtlich sind, ermittelt (de Groot, *et al.*, 2008). Des Weiteren wurde die Online-Arbeitsplattform *Psipred* angewandt, um die Sekundärstruktur der EpaA-Domänen vorhersagen zu lassen (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>). Somit konnten putative helikale Bereiche oder β -Faltblattstrukturen vorhergesagt werden, in denen nicht geschnitten werden sollte, um zu vermeiden, dass die Proteine in unlöslicher Form exprimiert werden. Zudem war zu Beginn dieser Arbeit die dreidimensionale Proteinstruktur der Epa1A-Domäne [Proteindatabank (PDB): 4AF9] gelöst, sodass Strukturmodelle aller EpaA-Domänen mit Hilfe des Online-Tools *Swiss-Modell* (<http://swissmodel.expasy.org/>) sowie dem Programm *EasyModeller 4.0* (Eswar, *et al.*, 2006) erstellt werden konnten. Die vorhergesagten Tertiärstrukturen der zu untersuchenden EpaA-Domänen konnten anschließend mit Hilfe des Programms *PyMOL* grafisch dargestellt werden (DeLano, 2002). Unter Berücksichtigung aller bioinformatischen Informationen wurden letztendlich die Grenzen der verschiedenen

EpaA-Domänen bestimmt, welche anschließend von der genomischen DNA des *C. glabrata* Wildtyp Stammes CBS138 amplifiziert wurden. Das Genom dieses Stammes ist bereits vollständig sequenziert und kodiert für 17 verschiedene *EPA*-Gene, die alle in dieser Arbeit untersucht wurden (Tabelle 40) (Dujon, *et al.*, 2004).

Da die Proteinstruktur der A-Domäne von Epa1 bereits zu Beginn dieser Arbeit bekannt war, sollte die Information auf die anderen 16 EpaA-Domänen übertragen werden, um anschließend Rückschlüsse und Vorhersagen bezüglich der, durch die Epa-Familie vermittelten, Bindung ziehen zu können (Maestre-Reyna, *et al.*, 2012). Aus diesem Grund wurde zunächst mittels *ClustalX2.0* ein Sequenzalignment mit den Sequenzen der Epa1A-Domäne, den weiteren 16 EpaA-Domänen aus dem *C. glabrata* Stamm CBS138, sowie den ebenfalls bekannten Sequenzen der A-Domänen von Epa4 und Epa5 aus dem *C. glabrata* Wildtypstamm BG2 erstellt (Larkin, *et al.*, 2007). Da zu Beginn dieser Arbeit neben der Struktur der A-Domäne von Epa1 (PDB: 4AF9) auch die des homologen Flo5 aus *S. cerevisiae* (PDB: 2XJP) gelöst war, konnte das Sequenzalignment durch strukturelle Informationen erweitert werden (Veelders, *et al.*, 2010, Maestre-Reyna, *et al.*, 2012). Hierzu wurde das Programm *T-Coffee*, insbesondere der spezielle Modus *3D-Coffee*, verwendet, um die strukturellen Informationen von Epa1A und Flo5A auf das Sequenzalignment zu übertragen (Notredame, *et al.*, 2000, O'Sullivan, *et al.*, 2004). Das so erhaltene strukturbasierte Sequenzalignment hilft bei der Identifizierung von Regionen, die sowohl die Ligandenbindung als auch Ligandenspezifität der Epa-Proteine beeinflussen könnten (Abbildung 12). Anhand des strukturbasierten Sequenzalignments lässt sich ableiten, dass die verschiedenen Epa-Proteine voraussichtlich auch in die PA14/Flo5-ähnliche Familie eingeordnet werden können, da sie wie Epa1A und Flo5A sowohl eine PA14-Domäne, als auch das charakteristische *DcisD*-Motiv als strukturelles Merkmal aufweisen. Im Fall von Epa1 wird das *DcisD*-Motiv durch die beiden Asparaginsäuren D165 und D166 gebildet, welche im CBL1 (*Calcium Binding Loop*) lokalisiert und innerhalb der Epa-Familie konserviert sind. Zusammen mit einem Asparaginst (N225) der CBL2-Region komplexiert das *DcisD*-Motiv ein zweiwertiges Calciumion, das den Lektinen die Glykanbindung ermöglicht. Somit bilden diese drei Aminosäuren die Bindungstasche des Calciumions, welches verschiedene Glykanliganden über Wechselwirkungen mit ihren Hydroxylgruppen bindet.

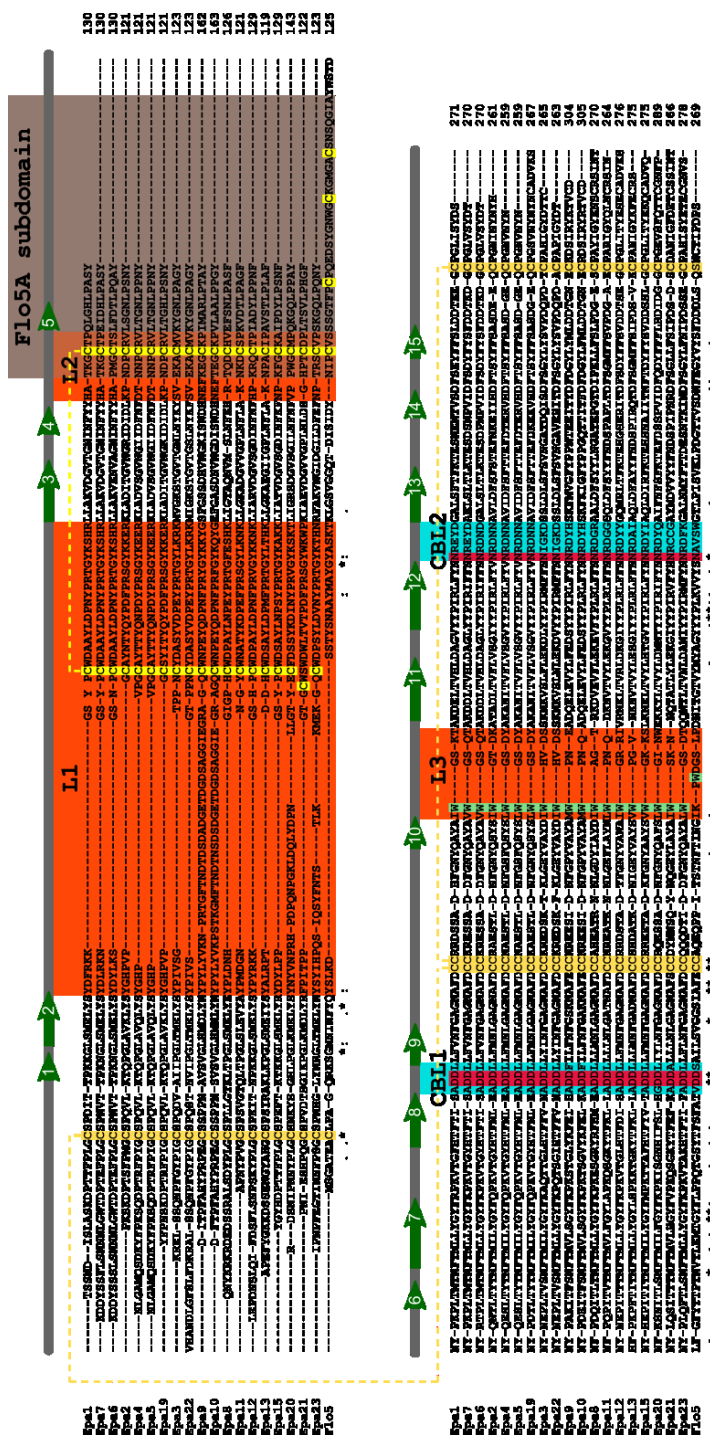


Abbildung 12: Strukturbasiertes Sequenzalignment der EpaA-Domänen aus *C. glabrata* und Flo5A aus *S. cerevisiae*.

Das strukturbasierte Sequenzalignment stellt alle A-Domänen der Epa-Familie des *C. glabrata* Stamm CBS138, Epa4A und Epa5A aus dem *C. glabrata* Stamm BG2 sowie Flo5A aus *S. cerevisiae* dar. Das Programm *T-Coffee*, insbesondere der spezielle Modus *3D-Coffee*, wurde verwendet, um die strukturellen Informationen von Epa1A und Flo5A auf das Sequenzalignment zu übertragen. Oberhalb des Alignments ist die Sekundärstruktur der A-Domäne von Epa1 abgebildet, die die PA14-Domäne bildet. Die äußere Bindungstasche setzt sich aus den Schleifen L1, L2 und L3 zusammen (hellbraun). Die innere Bindungstasche wird von den Regionen CBL1 und CBL2 gebildet (Cyan). Das *DcisD*-Motiv und N225 des CBL2 (Rot) sorgen für die Komplexierung eines Calciumions, welches zur Glykanbindung benötigt wird. Ebenfalls sind sechs Cysteinreste konserviert (gelb), die über Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind, sowie ein Tryptophan in L3 (grün).

Wie bereits erwähnt sind Epa-Proteine in der Lage an die Glykanstrukturen zu binden, welche sich auf der Oberfläche menschlicher Epithelzellen befinden (Zupancic, *et al.*, 2008). Die Ligandenbindungstasche von Epa1 setzt sich neben der Calcium-Bindungstasche aus fünf Schleifen zusammen, welche neben der Substraterkennung voraussichtlich an der Spezifitätsvermittlung beteiligt sind (Zupancic, *et al.*, 2008, Maestre-Reyna, *et al.*, 2012).

Das strukturbasierte Sequenzalignment zeigt, dass die Sequenzen der EpaA-Domänen, die normalerweise eine hohe Sequenzidentität zueinander besitzen, im Bereich der Schleifen hypervariabel sind. Daraus lässt sich ableiten, dass die verschiedenen EpaA-Domänen vermutlich unterschiedliche Bindungsspezifitäten vermitteln. Zudem wurde für Epa1 postuliert, dass die Ligandenbindungstasche in eine innere und eine äußere Bindungstasche aufgeteilt werden kann, wobei sich die Innere aus dem Argininrest (R226) der CBL2-Region, dem Tryptophan W198 der L3 Schleife und der Calcium-Bindungstasche zusammensetzt und sowohl Bindung als auch Spezifität zum terminalen Glykanrest vermittelt (Maestre-Reyna, *et al.*, 2012). Des Weiteren ist bekannt, dass Epa1A bevorzugt terminale Galactoside bindet, welche über Wasserstoffbrückenbindungen ihrer dritten und vierten Hydroxylgruppe mit dem Calciumion interagieren. Dabei ist die Orientierung der, in der Epa1A-Struktur gebundenen, Galactose im Vergleich zur Mannose, die von der Flo5A-Domäne gebunden wird, orthogonal verdreht (Veelders, 2008). Dies lässt sich darauf zurückführen, dass die Galactose durch Wechselwirkung ihrer zweiten und dritten Hydroxylgruppe mit dem Argininrest des CBL2 sowie durch van-der-Waals Wechselwirkungen mit dem Tryptophanrest W198 der L3 Schleife, der wie ein Deckel über der Galactose liegt, stabilisiert wird (Maestre-Reyna, 2011). Anhand des strukturbasierten Alignments lässt sich zeigen, dass das Tryptophan in der ganzen Epa-Familie konserviert ist, sodass davon ausgegangen werden kann dass alle Epa-Proteine terminale Galactoside bevorzugen (Abbildung 12). Für die äußere Bindungstasche von Epa1A, die sich aus den weiteren Aminosäureresten der CBL2-Region, sowie L1 und L2 zusammensetzt, wurde vorausgesagt, dass sie die Spezifität für den sekundären Glykanrest vermittelt. Dabei werden die beiden Schleifen L1 und L2 über eine Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen C78 und C119 miteinander verbunden und in ihrer Position fixiert. Wahrscheinlich sind bei allen EpaA-Domänen L1 und L2 miteinander verknüpft, da die Cysteine in L1 und L2 konserviert sind.

Um im nächsten Schritt die Verwandtschaft der EpaA-Domänen zueinander zu ermitteln, wurde mit Hilfe des Programms *NJplot*, das den *Neighbor-Joining*-Algorithmus verwendet (Perriere & Gouy, 1996), basierend auf dem strukturellen Sequenzalignment, ein phylogenetischer Baum erstellt (Abbildung 13). Dadurch lassen sich konservierte Sequenzbereiche identifizieren, die möglicherweise an der Vermittlung der Ligandenbindung und –spezifität beteiligt sind.

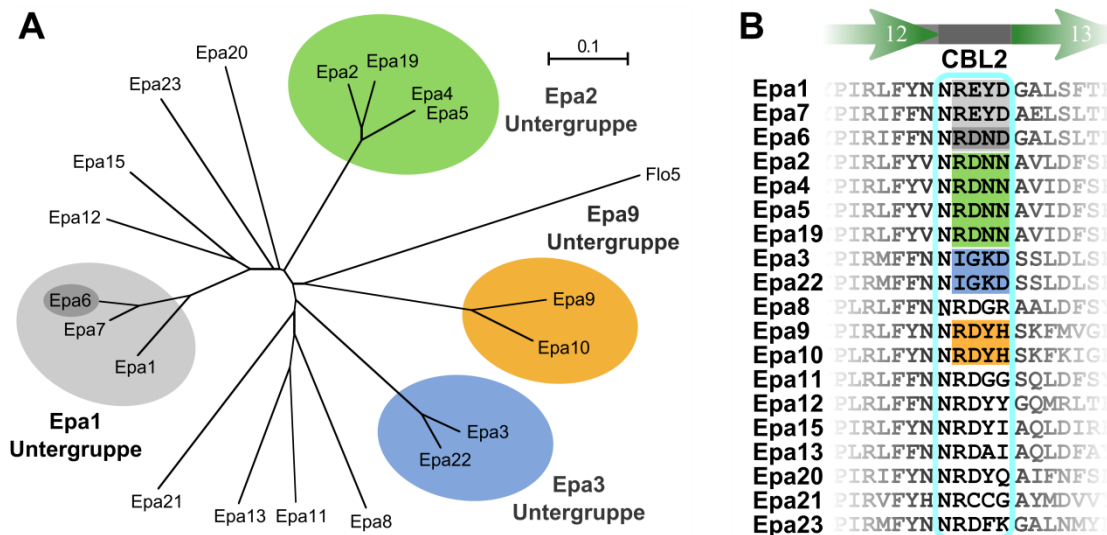


Abbildung 13: Strukturbasierte Phylogenie der EpaA-Domänen.

A) Stukturbasierte Verwandtschaft der 17 EpaA-Domänen des *C. glabrata* Stammes CBS138, sowie der A-Domänen von Epa4 und Epa5 des *C. glabrata* Stammes BG2. Die vier Untergruppen sind farblich hervorgehoben (Epa1: grau, Epa2: grün, Epa3: blau und Epa9: orange). Der Größenmaßstab gibt den phylogenetischen Abstand in Anzahl ausgetauschter Aminosäuren pro Position an. B) Alignment der CBL2-Regionen (cyan). Die vier Untergruppen sind farblich wie in A) entsprechend hervorgehoben.

Unter den 19 EpaA-Domänen bildeten sich vier Untergruppen aus, welche bezüglich ihrer Mitglieder Epa1- (Epa1A, Epa6A, Epa7A), Epa2- (Epa2A, Epa4A, Epa5A, Epa19A), Epa3- (Epa3A, Epa22A), und Epa9-Untergruppe (Epa9A, Epa10A) genannt wurden. Interessanterweise konnte beobachtet werden, dass die CBL2-Region innerhalb der einzelnen Untergruppen, bis auf eine Ausnahme konserviert ist (CBL2-Region von Epa6A \neq CBL2-Region der Epa1-Untergruppe). Die lokale Nähe der CBL2-Region zum Liganden, die anhand der Epa1A-Struktur beobachtet werden konnte, sowie die Tatsache, dass die CBL2-Region innerhalb der verschiedenen Untergruppen konserviert ist, lässt darauf schließen, dass diese maßgeblich an der Spezifitätsvermittlung beteiligt ist, und ein Spezifitätswechsel durch Austausch der CBL2-Region einer anderen Epa-Untergruppe hervorgerufen werden könnte.

Durch Lösung der Proteinstruktur der Epa1A-Domäne konnten bereits wichtige Erkenntnisse über die Funktionalität dieses Proteins gewonnen werden. So gehört Epa1A, wie Flo5A aus *S. cerevisiae* zur PA14/Flo5-ähnlichen Familie (Meaetre-Reyna, 2011). Anhand des strukturbasierten Sequenzalignments konnte gezeigt werden, dass voraussichtlich alle weiteren EpaA-Domänen in die gleiche Familie eingeordnet werden können, da sie sowohl eine PA14-Domäne, als auch das charakteristische DcisD-Motiv aufweisen. Des Weiteren konnten verschiedene Strukturmotive identifiziert werden, die voraussichtlich einen entscheidenden Beitrag zur Bindungsaffinität und -spezifität leisten und nachfolgend untersucht wurden.

2.2 Heterologe Herstellung der EpaA-Domänen

2.2.1 Heterologe Überproduktion und Aufreinigung der EpaA-Domänen

Die biochemische und kristallographische Charakterisierung der EpaA-Domänen soll Auskunft über die spezifische Adhäsion an verschiedene Glykanstrukturen und die Affinität gegenüber diesen liefern. Um diese sowohl qualitativen und quantitativen als auch strukturellen Analysen durchführen zu können, mussten die EpaA-Domänen zunächst in Form von löslichem und möglichst reinem Protein hergestellt werden (Abbildung 14).

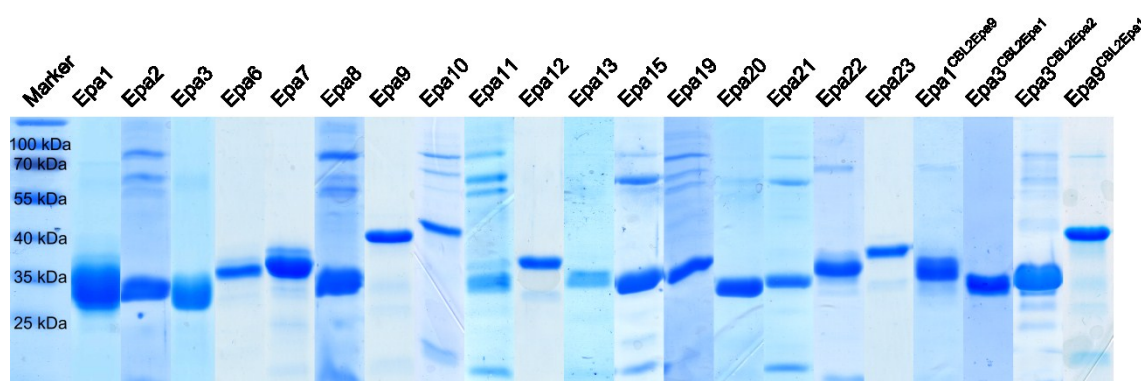


Abbildung 14: SDS-PAGE von EpaA-Domänen nach Größenausschlusschromatographie.

In jeder Spalte ist exemplarisch eine Proteinprobe nach dem letzten Aufreinigungsschritt abgebildet, um die Reinheit der einzelnen Proben darzustellen. Alle Proben wurden auf einen gemeinsamen Marker skaliert, um das Laufverhalten der verschiedenen A-Domänen zu beobachten.

Hierzu wurden alle 17 EPAA-Domänen des *C. glabrata* Stamm CBS138 zunächst mittels PCR amplifiziert und anschließend in den *E. coli* Expressionsvektor pET28a kloniert (Abschnitt 5.1.14). Die darauf folgende heterologe Expression erfolgte mit

Hilfe des *E. coli* Stammes SHuffle® T7 Express. Nach dem Zellaufschluss wurden die verschiedenen EpaA-Domänen mittels Ni-NTA und nachfolgender Größenausschlusschromatographie in lactosehaltigem Puffer aufgereinigt (Abschnitt 5.2.7). Zur anschließenden Identifizierung wurden die zu untersuchenden Proteinfragmente aus einem SDS-PAGE Gel ausgeschnitten, tryptisch verdaut und nachfolgend massenspektrometrisch über *Peptide Mass Fingerprinting* analysiert (Dr. Uwe Linne). Dabei konnten alle aus der SDS-PAGE extrahierten Banden als die erwarteten EpaA-Domänen identifiziert werden (Abbildung 14, Tabelle 2).

Tabelle 2: Überblick über die aus *E. coli* gereinigten heterologen EpaA-Domänen und nachfolgende Untersuchungen.

Protein	Ausbeute	CD-Spek.	CFG Array	K _D	Kristallisation
Epa1A	10 mg/ml	✓	✓	✓	✓
Epa2A	1 mg/ml	-	✓	-	✓
Epa3A	10 mg/ml	✓	✓	✓	✓
Epa6A	10 mg/ml	✓	✓	✓	✓
Epa7A	10 mg/ml	✓	✓	✓	✓
Epa8A	1 mg/ml	-	✓	-	-
Epa9A	10 mg/ml	✓	✓	-	✓
Epa10A	1 mg/ml	-	✓	-	-
Epa11A	1 mg/ml	-	✓	-	-
Epa12A	5 mg/ml	-	✓	✓	✓
Epa13A	1 mg/ml	-	✓	-	-
Epa15A	2 mg/ml	-	✓	-	-
Epa19A	1 mg/ml	-	✓	-	✓
Epa20A	1 mg/ml	-	✓	-	-
Epa21A	1 mg/ml	-	✓	-	-
Epa22A	5 mg/ml	-	✓	✓	-
Epa23A	10 mg/ml	✓	✓	✓	✓
Epa1A^{CBL2Epa9}	10 mg/ml	-	✓	✓	✓
Epa2A^{CBL2Epa1}	1 mg/ml	-	-	-	-
Epa2A^{CBL2Epa3}	1 mg/ml	-	-	-	-
Epa3A^{CBL2Epa1}	2 mg/ml	-	✓	-	-
Epa3A^{CBL2Epa2}	5 mg/ml	-	✓	-	✓
Epa6A^{CBL2Epa1}	2 mg/ml	-	-	-	-
Epa9A^{CBL2Epa1}	5 mg/ml	-	✓	-	✓

Tabelle 2 zeigt die erhaltenen Mengen an reinem löslichem Protein der verschiedenen EpaA-Domänen, welche über die heterologe Expression mittels *E. coli* erhalten wurden. Da die Ausbeute an löslichem Protein in reiner Form der beschränkende Faktor für

spätere *in vitro* Untersuchungen ist, wird zudem aufgeführt, welche Experimente mit den erhaltenen Mengen zur biochemischen Charakterisierung im Verlauf dieser Arbeit durchgeführt wurden.

2.2.2 Bestimmung des Sekundärstrukturgehalts und der thermischen Stabilität

Um Erkenntnisse über den Sekundärstrukturgehalt und die Schmelztemperatur, bzw. die Stabilität der Proteine zu erlangen, wurden Spektren einzelner EpaA-Domänen (Epa1A, Epa3A, Epa6A, Epa7A, Epa9A und Epa23A) mit circular polarisiertem Licht (Circulardichroismus-(CD)-Spektroskopie) aufgenommen. Um eine bessere Vergleichbarkeit zu ermöglichen, wurden die Messwerte in die molare Elliptizität pro Aminosäure umgewandelt. Anschließend wurden CD-Spektren im Fern-UV-Bereich (195 - 260 nm) aufgenommen, welche Informationen über den prozentualen Anteil verschiedener Sekundärstrukturelemente liefern. Hierzu wurde die *Jasco Secondary Structure Estimation* Software angewandt, welche die Probenspektren mit einem Referenzspektrum vergleicht und anhand dieses Vergleichs die Zusammensetzung an verschiedenen Sekundärstrukturmotiven berechnet (Abbildung 15).

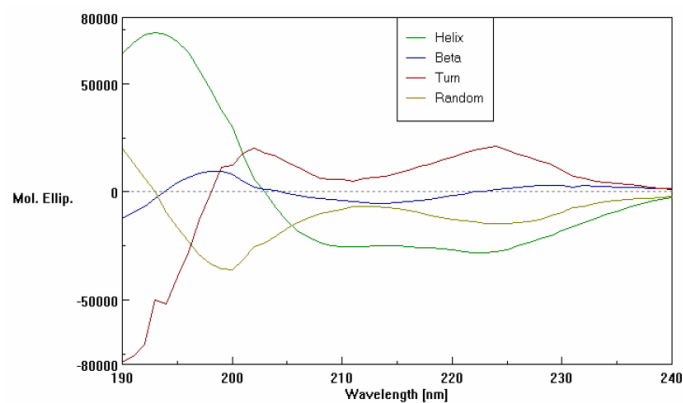


Abbildung 15: CD-Referenzspektrum zur Berechnung von Sekundärstrukturelementen.

Die bei verschiedenen Wellenlängen gemessene molare Elliptizität wird gegeneinander aufgetragen. Die erhaltenen Kurvenverläufe der Spektren entsprechen denen von α -Helices (grün), β -Faltblattstrukturen (blau), Schleifen (dunkelrot) und ungeordneten Bereichen (dunkelgelb).

Die gemessenen Spektren weisen mit circa 60 % alle einen sehr hohen Anteil an β -Faltblattstrukturen auf und decken sich mit den Sekundärstrukturvorhersagen, die für die einzelnen EpaA-Domänen bei der bioinformatischen Analyse mit Hilfe von *Psipred* ermittelt wurden. Des Weiteren untermauert der hohe gemessene Anteil an β -Faltblattstrukturen die mittels strukturbasierter Sequenzanalyse erhaltene Feststellung,

dass die verschiedenen EpaA-Domänen alle zur PA14/Flo5-ähnlichen Familie gehören, für die ein hoher Anteil antiparalleler β -Faltblattstrukturen charakteristisch ist. Neben den Messungen bei 10 °C, bei denen sich das Protein im nativen Zustand befindet, wurden auch Spektren des Proteins bei 95 °C aufgenommen (Abbildung 16).

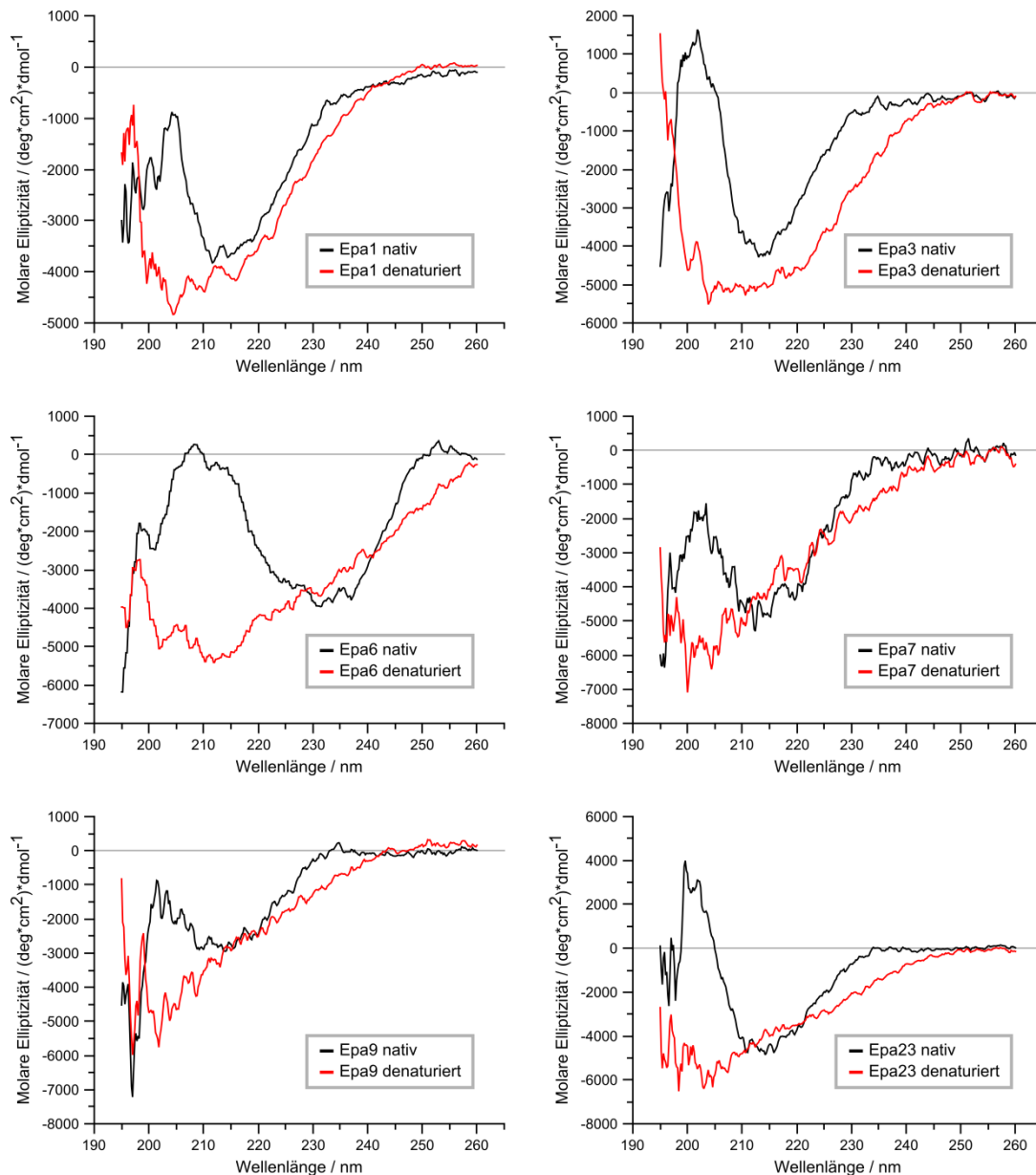


Abbildung 16: Fern-UV-Spektren von Epa1A, Epa3A, Epa6A, Epa7A, Epa9A und Epa23A.

Die Spektren wurden bei 10 °C und 95 °C aufgenommen, die Proteine befanden sich in einem 10 millimolaren Carbonat-Puffer (pH 8.3). Je A-Domäne ist ein Spektrum des nativen (schwarz) sowie des denaturierten (rot) Zustandes abgebildet. Alle A-Domänen weisen im nativen Zustand einen hohen Anteil an β -Faltblattstrukturen auf.

Neben den Spektren im Fern-UV-Bereich kann mit Hilfe der CD-Spektroskopie auch die thermische Stabilität und der Schmelzpunkt von Proteinen ermittelt werden

(Abbildung 66). Dazu wurden Schmelzkurven aufgenommen, bei denen die Proteinproben von 10 °C mit einer Temperaturerhöhung von 2 °C/min auf 95 °C erhitzt und anschließend wieder auf 10 °C abgekühlt wurden. Dabei wurde die Änderung der molaren Elliptizität bei der jeweiligen Wellenlänge beobachtet, bei der zuvor im dazugehörigen Fern-UV-Spektrum die größte Abweichung zwischen nativem und denaturiertem Protein gemessen wurde. Der Verlauf der Schmelzkurve wurde anschließend mit Hilfe des Programms *Qti-Plot* an eine Sigmoidalfunktion angepasst. Der dabei ermittelte Wendepunkt der S-Kurve gibt die Schmelztemperatur an (Tabelle 3).

Tabelle 3: Schmelztemperaturen verschiedener EpaA-Domänen.

A-Domäne	Epa1	Epa3	Epa6	Epa7	Epa9	Epa23
T _m / °C	78	66	85	76	60	64

Die verschiedenen EpaA-Domänen weisen mit durchschnittlich 71,5 °C relativ hohe Schmelztemperaturen auf, und besitzen demnach eine hohe thermische Stabilität, wobei die A-Domäne von Epa9 mit einer Schmelztemperatur von 60 °C die niedrigste thermische Stabilität aufweist.

2.3 Glycan Array Screening

2.3.1 Ermittlung von Bindungsspezifitätsprofilen der 17 EpaA-Domänen

Aus vorherigen Studien konnten bereits wichtige Informationen über die Ligandenspezifität der Epa1A-Domäne werden (Maestre-Reyna, *et al.*, 2012). Es wurden bisher jedoch noch keine biochemischen Untersuchungen an weiteren EpaA-Domänen unternommen. Aus diesem Grund sollte im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe des vom *Consortium for Functional Glycomics* (CFG, www.functionalglycomics.org) angebotenen *Glycan Array Screening*, die Ligandenspezifität der kompletten Epa-Familie des *C. glabrata* Stammes CBS138 bestimmt werden. Der dabei verwendete Glykan-Chip *Mammalian Printed Array version 5.1* (MPA V5.1) enthält 610 verschiedene Glykanliganden, wodurch die Bindung zu einer extrem großen Anzahl möglicher Glykanliganden getestet werden konnte. Zur Identifizierung putativer Bindungspartner wurden die rekombinant hergestellten EpaA-Domänen zunächst mit dem Fluoreszenzfarbstoff AlexaFluor 488 über primäre Amine der Proteine markiert, bei einer Konzentration von 200 µg/ml auf

den Chip gegeben, für 2 Stunden inkubiert und danach wieder abgewaschen. Um die Funktionalität der Bindungstasche zu gewährleisten, wurde bei den Messungen ein calciumhaltiger Puffer (CFG-Puffer) verwendet. Die Detektion der durch die fluoreszenzmarkierten EpaA-Domänen gebundenen Glykane erfolgte anschließend über Fluoreszenzauslesung des Glykan-Chips. Die relative Fluoreszenz (RFU) entspricht dabei der gemessenen Fluoreszenzintensität, die umso höher ist, je stärker der zugehörige Glykanligand durch die fluoreszenzmarkierte EpaA-Domäne gebunden wurde. Über die erhaltenen Werte wurden Bindungsspezifitätsprofile von den verschiedenen EpaA-Domänen erstellt, wobei die gemessenen Fluoreszenzintensitäten gegen die verschiedenen Glykane aufgetragen wurden (Abbildung 17, Abbildung 67).

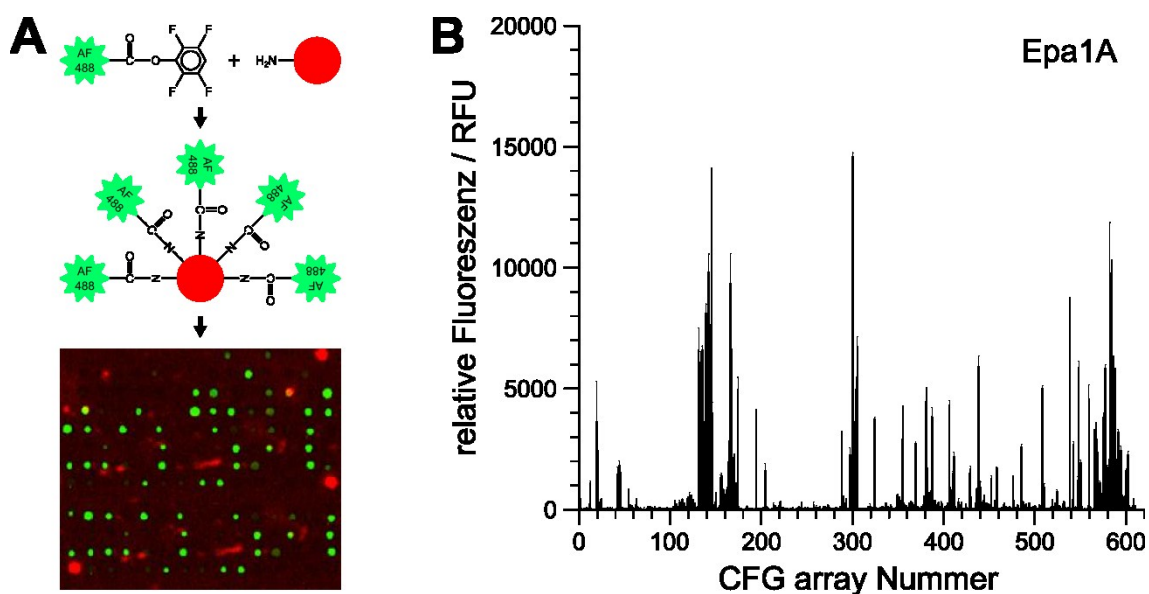


Abbildung 17: Versuchsdurchführung mit Bindungsspezifitätsprofil der Epa1A-Domäne.

A) Schematische Darstellung der Fluoreszenzmarkierung der Proteine, die anschließend auf dem Glykan-Chip für 2 h inkubiert werden. Nach einem Waschschritt wurden die Fluoreszenzsignale der auf dem Chip bindenden Proteinproben ausgelesen. B) Es wurde der Glykan-Chip MPA V5.1 verwendet. Dieser Chip präsentiert 610 verschiedene putative Glykanliganden. Die CFG array Nummern stellen die Identifikationsnummern der verschiedenen Glykane dar, die auf jedem Chip in der gleichen Reihenfolge angeordnet sind (Anhang 6.5). Alle Profile wurden bei einer Proteinkonzentration von 200 µg/ml aufgenommen. Die Bindungsaffinität zu den einzelnen Glykanen spiegelt sich in den verschiedenen Fluoreszenzintensitäten (relative Fluoreszenz / RFU) wieder.

Anhand der Bindungsspezifitätsprofile wurden für die einzelnen EpaA-Domänen unterschiedlich hohe Fluoreszenzintensitäten an unterschiedlichen Stellen beobachtet, was dafür spricht, dass die einzelnen EpaA-Domänen die verschiedenen Glykanliganden unterschiedlich stark binden und somit eigene Spezifitätsprofile zeigen. Dabei muss jedes Bindungsspezifitätsprofil allerdings isoliert betrachtet werden und die ermittelten Fluoreszenzintensitäten, die für ein Protein gemessen wurden, können nur

untereinander verglichen werden. Dabei sollten von der relativen Fluoreszenz keine Rückschlüsse auf die Bindungsstärke der einzelnen EpaA-Domänen untereinander gezogen werden, da die maximale Fluoreszenzintensität unter anderem von der Effizienz der Fluoreszenzmarkierung der einzelnen Proteine abhängig ist, die schon allein aufgrund der unterschiedlichen Anzahl an primären Aminen variieren kann. Die relative Fluoreszenz darf in Bezug auf die Bindungsstärke somit höchstens als Tendenz gesehen werden. Es zeigte sich, dass jede der 17 verschiedenen EpaA-Domänen ein eigenes Bindungsspezifitätsprofil besitzt, die Profile aber auch Ähnlichkeiten zueinander aufweisen (Abbildung 67). Für die Bindungsspezifitätsprofile von Epa2A, Epa8A, Epa11A, Epa19A, Epa20A und Epa21A konnten beispielsweise nur geringe Fluoreszenzintensitäten gemessen werden. Dies könnte daran liegen, dass für diese EpaA-Domänen nur sehr geringe Gesamtausbeuten an löslichem Protein gewonnen werden konnten und dadurch der Anteil an instabilem und inaktivem Protein höher als bei den gut exprimierten Proteinen ist. Es könnte aber auch sein, dass diese EpaA-Domänen nur sehr unspezifisch binden oder mögliche Liganden nicht auf dem Glykan-Chip präsentiert werden.

2.3.2 Funktionsbasierte Verwandtschaft der EpaA-Domänen

In einem nächsten Schritt wurden die verschiedenen EpaA-Domänen bezüglich ihrer Bindungsspezifitätsprofile weiter klassifiziert. Dazu wurde basierend auf den 10370 Werten, die mittels semi-quantitativen *Glycan Array Screening* erhalten wurden, eine hierarchische Clusteranalyse mit Hilfe der Programme *Cluster 3.0* und *Java TreeView* durchgeführt, welche die A-Domänen der Epa-Familie in zwei große Gruppen mit jeweils 11 und 6 Mitgliedern einteilt (Abbildung 18, Tabelle 4) (Eisen, *et al.*, 1998, de Hoon, *et al.*, 2004, Saldanha, 2004). Dabei fällt auf, dass die meisten Mitglieder der Gruppe 1 hohe maximale Fluoreszenzintensitäten von über 1000 Einheiten im CFG-Profil aufweisen. Für die Gruppe 2 zeigt sich ein gegenteiliges Bild, denn nur Epa21A bindet bevorzugt Liganden mit einer Fluoreszenzintensität von mehr als 1000 Einheiten (Abbildung 67). Die geringen maximalen Fluoreszenzintensitäten, welche für die Mitglieder der Gruppe 2 gemessen wurden, gehen zudem mit einer geringer ausgeprägten Spezifität einher, die sich durch eine geringere Unterscheidung der relativen Adhäsion widerspiegelt (Abbildung 18, Gelb/Blau-Kontrast).

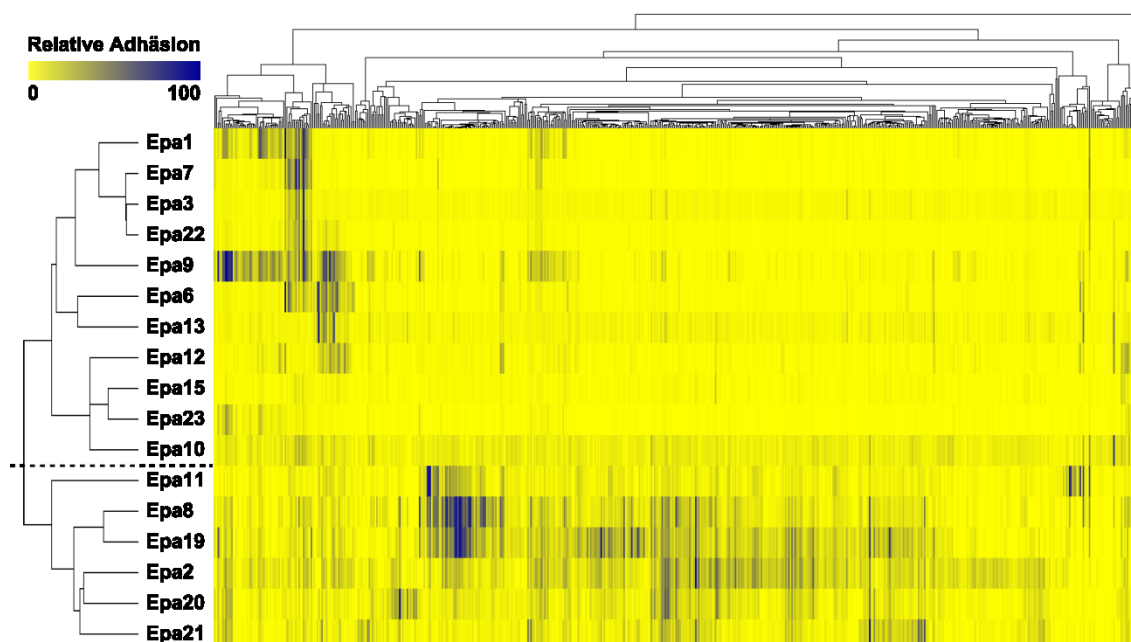


Abbildung 18: Verwandtschaft der 17 EpaA-Domänen basierend auf den dazugehörigen Glykan-Profilen.

Die Mitglieder der Epa-Familie des *C. glabrata* Stammes CBS138 wurden mittels hierarchischer Clusteranalyse, entsprechend der mit Hilfe der CFG-Analysen ermittelten relativen Bindungsaffinitäten zu 610 putativen Glykan-Liganden, gruppiert. Hierzu wurden die Programme *Cluster 3.0* und *Java TreeView* verwendet. Die Verwandtschaft der Epa-Proteine wird durch den Baum unter dem Cluster abgebildet, wohingegen die Verwandtschaft der 610 Glykane zueinander links abgebildet ist. Vor der Clusteranalyse wurden die Fluoreszenzintensitäten der verschiedenen EpaA-Domänen auf einen Wert von 100 bezüglich des am besten gebundenen Glykanliganden normiert. Die relative Bindungsstärke ist farblich dargestellt und reicht von keiner Bindung (0 in gelb) bis maximale Bindung (100 in blau).

Tabelle 4: Gruppierung der EpaA-Domänen anhand der Bindungsspezifitätsprofile.

Gruppe 1		Gruppe 2	
Gruppe 1A	Epa1A, Epa7A, Epa3A, Epa22A	Gruppe 2A	Epa11A
Gruppe 1B	Epa9A	Gruppe 2B	Epa8A, Epa19A,
Gruppe 1C	Epa6A, Epa13A		Epa2A, Epa20A,
Gruppe 1D	Epa12A, Epa15A, Epa23A, Epa10A		Epa21A

Für eine genauere Betrachtung der Ergebnisse des hierarchischen Clustering wurden nachfolgend die am besten gebundenen Liganden der einzelnen EpaA-Domänen, die anhand der CFG-Analysen ermittelt wurden, miteinander verglichen. Hierbei wurde darauf geachtet, dass sich der endständige Glykanrest und die nachfolgende

Verknüpfung im Fall eines verzweigten Glykanliganden nicht unterscheiden, sodass die Spezifität eindeutig zugeordnet werden kann (Abbildung 19).

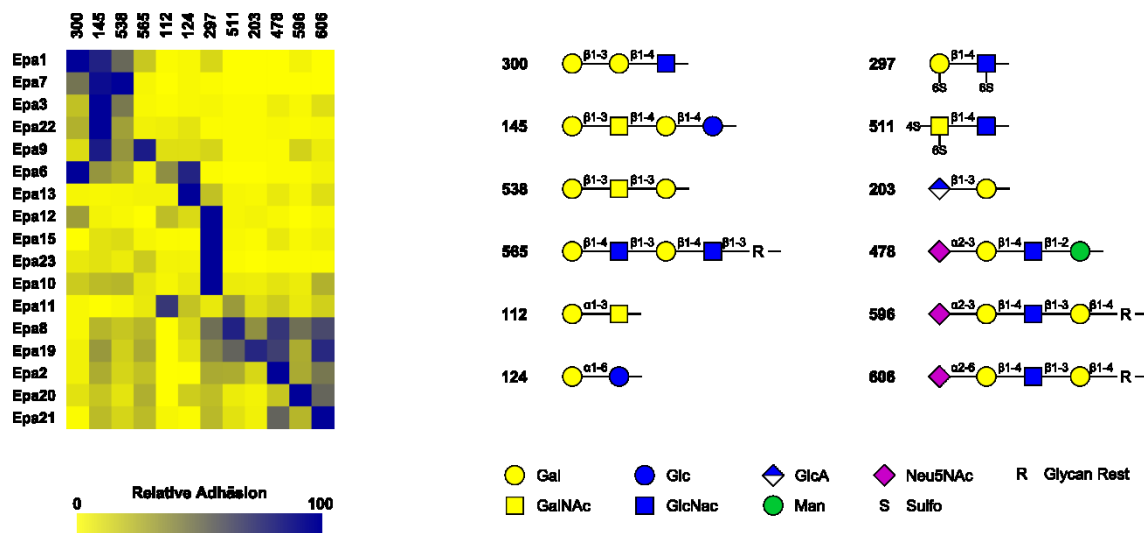


Abbildung 19: Best-Binder Analyse der 17 EpaA-Domänen.

Vergleich der Bindungsaffinitäten verschiedener EpaA-Domänen zu den am besten gebundenen Glykanliganden aus der hierarchischen Clusteranalyse. Rechts sind die terminalen Glykanreste der am besten gebundenen Liganden gemäß CFG-Nomenklatur dargestellt. Die Nummer entspricht der Position auf dem verwendeten Glykan-Chip MPA V5.1. Die relative Bindungsstärke ist farblich dargestellt und reicht von keiner Bindung (0 in gelb) bis maximale Bindung (100 in blau).

Die EpaA-Domänen der Gruppe 1 präferieren alle Glykane, die einen terminalen Galactoserest aufweisen. Zudem vermitteln sie eine klare Bevorzugung ihres am besten gebundenen Liganden, was sich anhand des starken Gelb/Blau-Kontrast im Vergleich zu den anderen dargestellten Glykanliganden widerspiegelt. Weiterhin fällt auf, dass alle EpaA-Domänen der Gruppe 1A (Epa1A, Epa7A, Epa3A, Epa22A) bevorzugt terminale Galactose mit β 1-3-Verknüpfung binden. Auch Epa9A (Gruppe 1B) zeigt eine hohe Affinität zu endständiger, β 1-3-verknüpfter Galactose, präferiert jedoch terminale β 1-4-verknüpfte Galactoside. EpaA-Domänen der Gruppe 1C (Epa6A, Epa13A) bevorzugen terminale α -verknüpfte Galactoside und Mitglieder der Gruppe 1D (Epa12A, Epa15A, Epa23A, Epa10A) Glykane mit terminaler sulfatierter Galactose. Die EpaA-Domänen der Gruppe 2 (Epa11A, Epa8A, Epa19A, Epa2A, Epa20A, Epa21A) zeigen eine geringere Unterscheidung der relativen Affinität zu den verschiedenen Liganden. Zudem bevorzugen lediglich Epa8A und Epa11A (Gruppe 2) Glykane mit terminalem Galactoserest, wohingegen die anderen Mitglieder dieser Gruppe eine spezifische Bindung zu Glykanen mit sauren terminalen Glykanresten, wie *N*-Acetylneuraminsäure oder Glucuronsäure vermitteln.

2.3.3 Klassifizierung anhand terminaler Glykanstrukturen

Aufgrund der Beobachtung, dass alle EpaA-Domänen der ersten Gruppe 1, sowie Epa8A und Epa11A, ein Glykan mit terminalem Galactoserest am besten gebunden haben, sollte weiter überprüft werden, wie sich die Bindungsspezifität der EpaA-Domänen zu verschiedenen terminalen Galactosiden verhält. Dabei sollte die Verknüpfung zum sekundären Glykanrest mitberücksichtigt werden. Hierzu wurden die Glykane des Arrays in 15 verschiedene Galactosid-Klassen aufgeteilt (Abbildung 20).

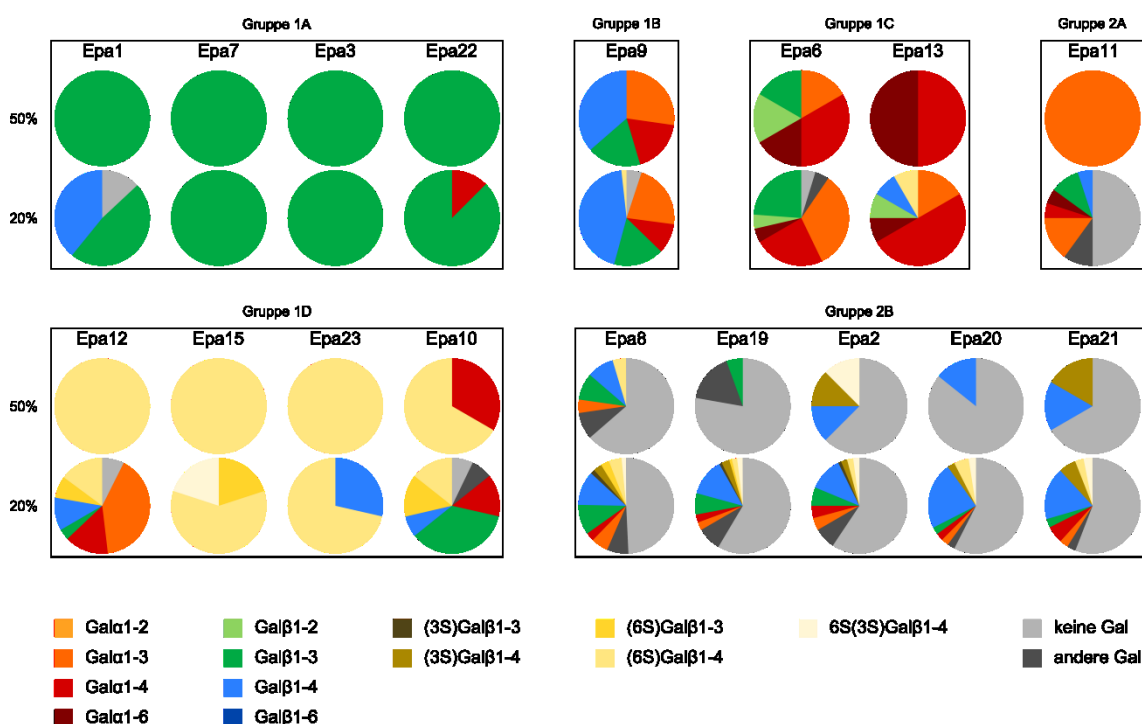


Abbildung 20: Ligandenbindungsprofile der EpaA-Domänen unter Berücksichtigung terminaler Galactoside.

Die Tortendiagramme repräsentieren die Bindung der EpaA-Domänen von verschiedenen terminalen Galactosid-Klassen, die eine relative Fluoreszenzintensität von $\geq 20\%$ oder $\geq 50\%$ der relativen Fluoreszenzintensität des bestgebundenen Liganden aufweisen (Tabelle 43 und Tabelle 44). Es wurden ausschließlich verzweigte Glykan-Liganden berücksichtigt, die eindeutig einer Gruppe an terminalen Galactosiden und der darauffolgenden Verknüpfung zugeordnet werden konnten. Der Farbcode für die unterschiedlichen Galactosid-Typen ist unterhalb der Tortendiagramme abgebildet.

Allgemein zeigt sich bei dieser Analyse, dass die Ligandenbindungsprofile der Mitglieder der einzelnen Gruppen eine deutliche Verwandtschaft aufweisen. So vermitteln Epa1A, Epa7A, Epa3A und Epa22A (Gruppe 1A) bevorzugt Bindung zu β 1-3-verknüpften Galactosiden. Epa9A (Gruppe 1B) zeigt Bindung zu terminaler Galactose mit α - als auch β -Verknüpfung und unterscheidet nicht zwischen 1-3- und 1-4- Verknüpfungen. Zudem präferiert Epa9A, im Gegensatz zu den anderen EpaA-Domänen, hochverzweigte terminale Galactoside. Epa6A und Epa13A

(Gruppe 1C), vermitteln Bindung zu α -verknüpften Galactosiden, wobei Epa6A auch Adhäsion zu terminalen β 1-4-verknüpften Galactosiden vermittelt und somit eine ähnliche Spezifität wie Epa9A vermittelt. Auch die A-Domäne von Epa1 vermittelt, neben der Bindung zu endständigen β 1-3-verknüpften Galactosiden, Bindung zu β 1-4-Verknüpfungen, weshalb sich zwischen den einzelnen Gruppen fließende Übergänge der Spezifität erkennen lassen, da die EpaA-Domänen einer Gruppe nicht ausschließlich Bindung zu einer Galactosid-Klasse zeigen. Dies kann auch für die Gruppe 1D beobachtet werden, deren Mitglieder bevorzugt Adhäsion an sulfatierte Galactoside zeigen. Epa12A bindet aber beispielsweise auch an α -verknüpfte, Epa23A an β 1-3-verknüpfte und Epa10A an α - und β 1-4-verknüpfte terminale Galactoside. Epa15A vermittelt hingegen Bindung an verschiedene, terminale, sulfatierte Galactosereste. Die Mitglieder der Gruppe 2 (Epa2A, Epa8A, Epa11A, Epa19A, Epa20A und Epa21A) zeigen überwiegend Bindung an Glykane, die keine Galactose als endständigen Glykan präsentieren. Allerdings wurden bei dieser Gruppe generell nur niedrige Fluoreszenzintensitäten gemessen. Einzig Epa11A hebt sich trotz geringer Fluoreszenzintensitäten von dieser Gruppe ab, da die Ligandenbindungsprofile zeigen, dass es im Gegensatz zu allen anderen Mitgliedern der Gruppe, bei Betrachtung der 50 % Grenze, ausschließlich α 1-3-verknüpfte Galactoside bindet. Dies zeigt erneut die Sonderstellung von Epa11A innerhalb der Gruppe 2, die sich bereits aus dem hierarchischen Clustering ergab.

2.3.4 Bindung isolierter Disaccharide

Neben der Bindung terminaler Reste von komplexen Glykanen sollte auch die Bindung an isolierte Disaccharide betrachtet werden, die auf dem Glykan-Chip präsentiert werden. Dies ist von Interesse, da bei den nachfolgenden biochemischen Ermittlungen der Bindungskonstanten, Disaccharide als Liganden eingesetzt werden sollten. Im Gegensatz zur Analyse der terminalen Galactoside wurden keine 20 % und 50 % Grenzen gesetzt, um relative Bindungsaffinitäten betrachten zu können. Dies ermöglicht Aussagen bezüglich der Rolle des sekundären Glykanrests bei der Bindungsspezifität. Für eine bessere Vergleichbarkeit sind bei den Abbildung 21 bis Abbildung 24 die Bindungsprofile der EpaA-Domänen innerhalb der Gruppe 1A, Gruppe 1B, 1C und 2A, Gruppe 1D und Gruppe 2B dargestellt.

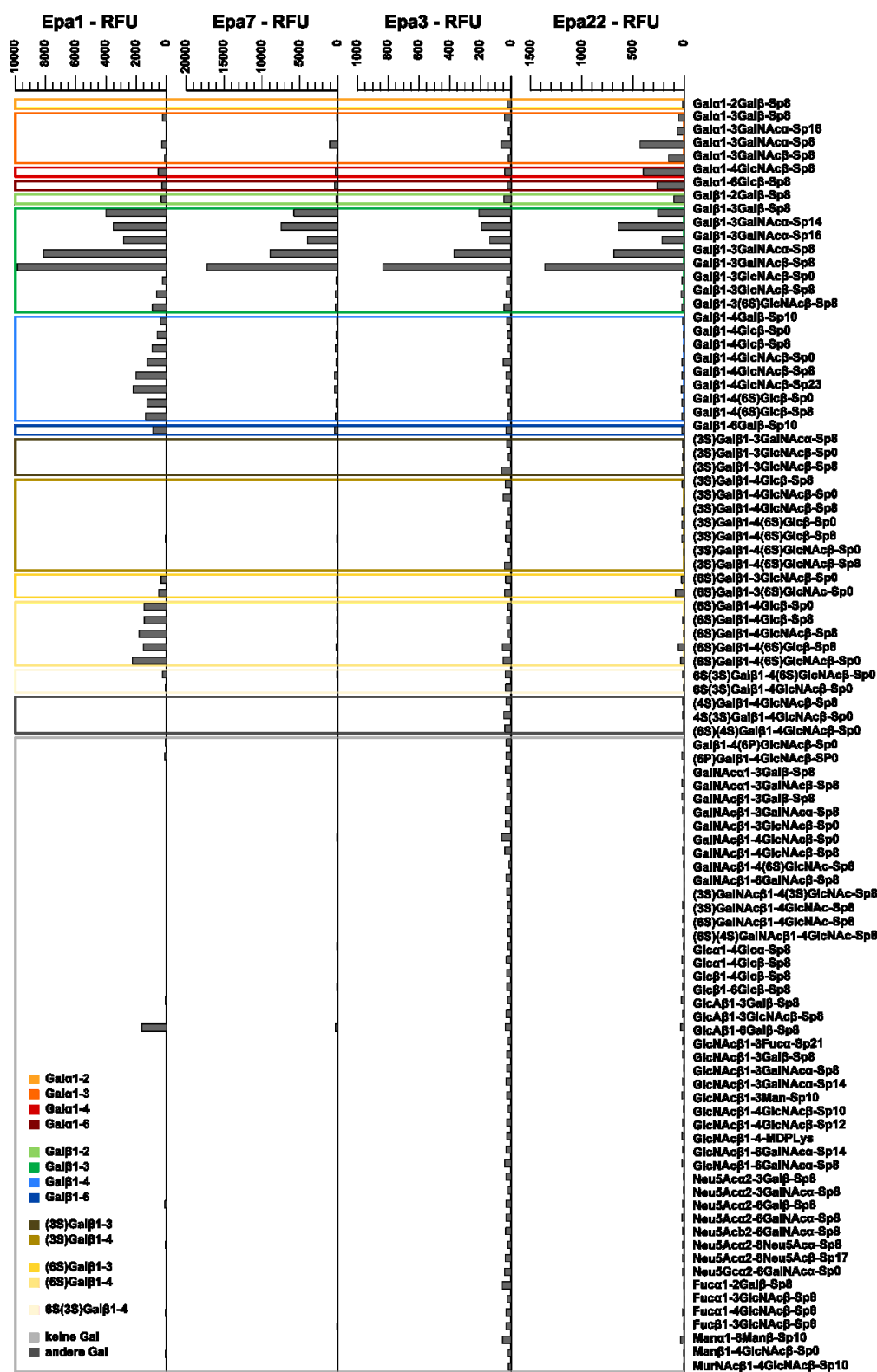


Abbildung 21: Bindung von Disacchariden durch Mitglieder der Gruppe 1A.

Bindungsprofile die durch Untersuchung der Bindung von Epa1A, Epa7A, Epa3A und Epa22A an alle 94 Disaccharide, die auf dem Glykan-Chip MPA V5.1 präsentiert werden, erhalten wurden. Die verschiedenen Galactosid-Typen sind durch unterschiedlich farbige Boxen hervorgehoben. Die Bindungsaffinität zu den einzelnen Disacchariden spiegelt sich in der Höhe der relativen Fluoreszenz wider. Die Werte entsprechen den Fluoreszenzintensitäten die mit einer Proteinkonzentration von 200 μ g/ml erhalten wurden.

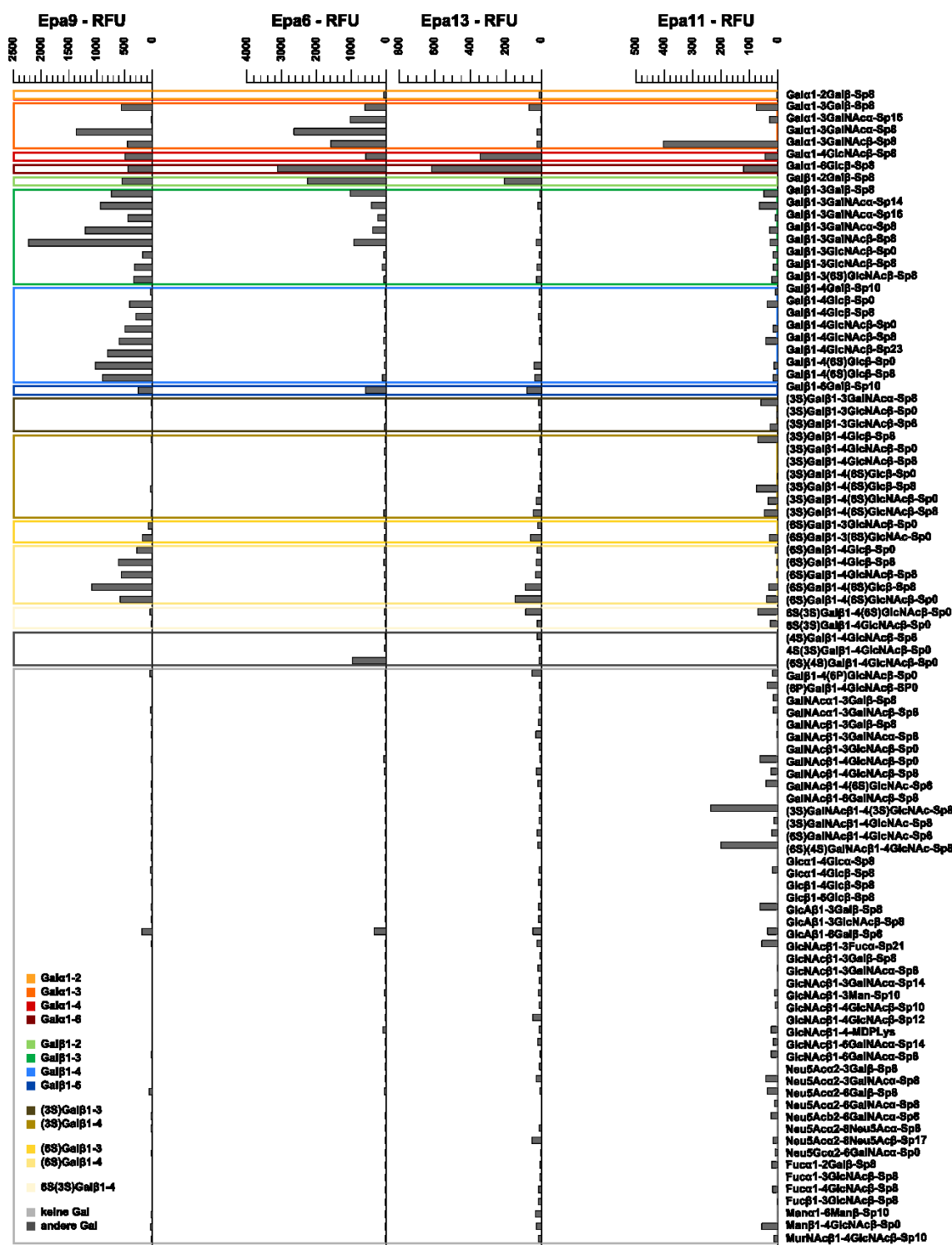


Abbildung 22: Bindung von Disacchariden durch Mittglieder der Gruppen 1B, 1C und 2A.

Bindungsprofile die durch Untersuchung der Bindung von Epa9A (Gruppe 1B), Epa6A, Epa13A (Gruppe 1C) und Epa11A (Gruppe 2A) an alle 94 Disaccharide, die auf dem Glykan-Chip MPA V5.1 präsentiert werden, erhalten wurden. Die verschiedenen Galactosid-Typen sind durch unterschiedlich farbige Boxen hervorgehoben. Die Bindungsaffinität zu den einzelnen Disacchariden spiegelt sich in der Höhe der relativen Fluoreszenz wider. Die Werte entsprechen den Fluoreszenzintensitäten die mit einer Proteinkonzentration von 200 µg/ml erhalten wurden.

Bindungsprofile die durch Untersuchung der Bindung von Epa12A, Epa15A, Epa23A und Epa10A an alle 94 Disaccharide, die auf dem Glykan-Chip MPA V5.1 präsentiert werden, erhalten wurden. Die verschiedenen Galactosid-Typen sind durch unterschiedlich farbige Boxen hervorgehoben. Die Bindungsaffinität zu den einzelnen Disacchariden spiegelt sich in der Höhe der relativen Fluoreszenz wider. Die Werte entsprechen den Fluoreszenzintensitäten die mit einer Proteinkonzentration von 200 µg/ml erhalten wurden.

Bindungsprofile die durch Untersuchung der Bindung von Epa8A, Epa19A, Epa2A, Epa20A und Epa21A an alle 94 Disaccharide, die auf dem Glykan-Chip MPA V5.1 präsentiert werden, erhalten wurden. Die verschiedenen Galactosid-Typen sind durch unterschiedlich farbige Boxen hervorgehoben. Die Bindungsaffinität zu den einzelnen Disacchariden spiegelt sich in der Höhe der relativen Fluoreszenz wider. Die Werte entsprechen den Fluoreszenzintensitäten die mit einer Proteinkonzentration von 200 µg/ml erhalten wurden.

Erwartungsgemäß spiegeln die Bindungsprofile der 17 EpaA-Domänen, unter ausschließlicher Berücksichtigung der Bindung an die 94 Disaccharide, die auf dem Glykan-Chip präsentiert werden, die bereits erhaltenen Ergebnisse wider. Die EpaA-Domänen der Gruppe 1A binden bevorzugt β 1-3-verknüpfte terminale Galactoside. Lediglich Epa1A zeigt zudem Bindung an β 1-4-verknüpfte Disaccharide mit terminaler Galactose und an sulfatierte Galactoside. Für Epa22A kann neben der Bindung von Gal- β 1-3-verknüpften Disacchariden auch Bindung von Gal α -verknüpften Disacchariden beobachtet werden. Epa9A der Gruppe 1B zeigt Bindung an unterschiedlich verknüpfte Disaccharide mit terminalem Galactoserest. Zudem weist das Bindungsprofil von Epa9A eine große Ähnlichkeit zu dem von Epa1A auf, mit der Ausnahme, dass Epa9A zudem α -verknüpfte Galactoside bindet. Die Mitglieder der Gruppe 1C Epa6A und Epa13A vermitteln Adhäsion an α -verknüpfte Disaccharide, wobei Epa6A α 1-4- sowie α 1-6- und Epa13A α 1-3- und α 1-6-Verknüpfungen bevorzugt bindet. Zudem adhären Epa6A und Epa13A noch schwach an Disaccharide mit Gal- β 1-6-Terminus, was ansonsten nur für Epa1A und Epa9A beobachtet werden kann. Charakteristisch für die EpaA-Domänen der Gruppe 1D ist, dass auch bei der Adhäsion an Disaccharide fast ausschließlich sulfatierte Galactoside gebunden werden. Lediglich Epa12A zeigte noch Adhäsion an Galactose, der entweder eine α 1-3- oder eine α 1-4-Verknüpfung folgt, sowie Disaccharide, die eine terminale Galactose tragen und β 1-4 mit einem sulfatierten Glucoserest verbunden sind. Ansonsten zeigt Epa10A Ähnlichkeit zu den Profilen von Epa1A und Epa9A, da es neben sulfatierten Galactosiden auch an nicht-sulfatierte α 1-4-verknüpfte Galactoside und Disaccharide mit Gal β 1-3-Terminus bindet. Des Weiteren kann beobachtet werden, dass ausschließlich Disaccharide gebunden werden, bei denen das sechste Kohlenstoffatom der terminalen Galactose sulfatiert ist. Für die Gruppe 2 kann keine bevorzugte Bindung einer Glykan-Klasse beobachtet werden, auch nicht zu sauren Glykanresten, die durch die Best-Binder Analyse als putative Liganden in Frage gekommen wären. Dies unterstützt die Annahme, dass Proteine der Gruppe 2 unspezifische, schwache Ligandenbindung vermitteln. Lediglich Epa11A aus der Gruppe 2A vermittelt bevorzugt Bindung an α 1-3-verknüpfte Galactoside und Adhäsion an zwei der vier Disaccharide mit terminaler sulfatierter als auch *N*-Acetylierter Galactose.

Um die relativen Bindungsstärken noch besser miteinander vergleichen zu können, wurde die durchschnittliche relative Fluoreszenzintensität der Disaccharide innerhalb

der einzelnen Galactosid-Klassen bestimmt und durch die durchschnittlich gemessene Fluoreszenzintensität aller Disaccharide geteilt (Tabelle 5).

Tabelle 5: Relative Bindungsstärke der EpaA-Domänen zu Disacchariden der verschiedenen Galactosid-Klassen im Vergleich zur durchschnittlich gemessenen Fluoreszenzintensität.

A-Domäne	Epa1	Epa2	Epa3	Epa6	Epa7	Epa8	Epa9	Epa10	Epa11	Epa12	Epa13	Epa15	Epa19	Epa20	Epa21	Epa22	Epa23
Gal α 1-2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gal α 1-3	0	1	1	3	1	1	2	0	4	2	0	1	1	0	0	2	0
Gal α 1-4	1	1	1	1	1	2	2	5	1	4	3	0	0	0	1	4	0
Gal α 1-6	0	0	1	5	1	1	1	0	3	1	6	0	1	2	0	3	1
Gal β 1-2	1	0	1	4	0	0	2	1	0	0	2	0	1	0	2	1	0
Gal β 1-3	6	1	5	1	11	1	3	1	1	0	0	1	1	0	1	4	0
Gal β 1-4	2	1	1	0	0	1	2	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1
Gal β 1-6	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
(3S)Gal β 1-3	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0
(3S)Gal β 1-4	0	2	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	2	2	0	0
(6S)Gal β 1-3	1	0	1	0	0	2	0	1	0	2	0	2	1	1	2	1	2
(6S)Gal β 1-4	3	1	1	0	0	2	2	3	1	3	1	8	1	2	1	0	10
6S(3S)Gal β 1-4	0	4	1	0	0	2	0	1	1	1	1	2	3	3	3	0	0
keine Gal	0	2	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	2	1	1	0	0
andere Gal	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0

Diese Auswertung zeigt, dass alle EpaA-Domänen der Gruppe 1 und Epa11A Disaccharide mit terminalem Galactoserest bevorzugen. Zudem zeigt sich, dass fast jede der 15 Galactosid-Klassen von mindestens einer EpaA-Domäne gebunden wird. Schwache Bindungen können lediglich zu Disacchariden beobachtet werden, deren terminaler Galactoserest *N*-acetyliert oder am dritten C-Atom sulfatiert ist oder die keine terminale Galactose aufweisen.

2.3.5 Bindung an isolierte Monosaccharide

In einem letzten Schritt wurde die Bindung der EpaA-Domänen an die 27 Monosaccharide, die auf dem Glykan Chip vorhanden sind, untersucht. Hiermit sollte die aus den vorherigen Analysen postulierte Präferenz zu Galactose als primären Glykan überprüft werden. Diese Analyse erfolgte wie bereits für die isolierten Disaccharide beschrieben. Dabei vermitteln Epa1A, Epa6A, Epa7A, Epa9A, Epa10A, Epa11A, Epa12A, Epa13A, Epa15A, Epa22A und Epa23A eine deutliche Bindung zu Galactose (Abbildung 25). Die auf dem Array vorhandene sulfatierte Galactose wird nicht effizient durch die verschiedenen EpaA-Domänen gebunden, auch nicht von den Mitgliedern der Gruppe 1D. Dies ist vermutlich auf die Tatsache zurückzuführen, dass der präsentierte Galactoserest am dritten Kohlenstoffatom sulfatiert ist.

Bindungsprofile die durch Untersuchung der Bindung aller EpaA-Domänen an die 27 Monosaccharide (x-Achse), die auf dem Glykan Chip MPA V5.1 präsentiert werden, erhalten wurden. Galactoseeinheiten sind zusätzlich hervorgehoben (Gal in rot und GlcNAc in grau). Die Werte entsprechen den Fluoreszenzintensitäten die mit einer Proteinkonzentration von 200 µg/ml erhalten wurden.

Bindung von terminalen Galactosiden, die am dritten Kohlenstoffatom sulfatiert sind, konnte auch bei vorherigen Untersuchungen nicht beobachtet werden. Für die A-Domänen von Epa8A und Epa20A kann ebenfalls eine Bindung zu Galactose, sowie sulfatierter, *N*-acetylierter Galactose beobachtet werden, wobei letzterer Glykanrest ebenfalls von Epa2A, Epa19A und Epa21A gebunden wird. Diese EpaA-Domänen binden jedoch teilweise noch andere Monosaccharide, die keine Gemeinsamkeiten zueinander aufweisen, was die eher unspezifische Bindung dieser EpaA-Domänen weiter unterstreicht.

2.3.6 CFG-Titrationsanalysen mit Epa1A, Epa9A, Epa12A und Epa23A

2.3.6.1 Bindungsspezifitätsprofile bei verringerter Proteinkonzentration

Die bisher gezeigten Daten stammen aus CFG-Profilen, die mit Proteinkonzentrationen von 200 µg/ml erstellt wurden. Die Proteine liegen bei dieser Proteinkonzentration in hohem Überschuss gegenüber den auf dem Array vorhandenen Ligandenmolekülen vor, und eine Untersuchung jeweils hocheffizient gebundener Liganden ist in diesem Sättigungsbereich nur schwer möglich (Maestre-Reyna, *et al.*, 2012). Daher wurden für die A-Domänen Epa1A, Epa9A, Epa12A und Epa23A, welche in hohen Ausbeuten gewonnen wurden, zusätzlich Glykan-Arrays mit einer geringeren Proteinkonzentrationen von 20 µg/ml oder 50 µg/ml durchgeführt und anschließend wie bereits beschrieben analysiert (Abbildung 26, Abbildung 68).

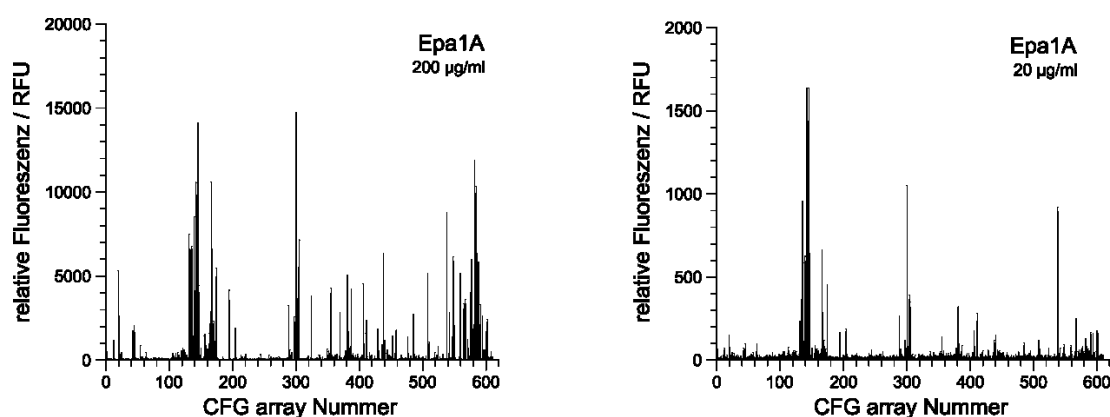


Abbildung 26: Bindungsspezifitätsprofile der Epa1A-Domäne bei zwei Proteinkonzentrationen.

Es wurde der Glykan-Chip MPA 5.1 mit 610 verschiedene putative Glykanliganden verwendet. Die CFG array Nummern stellen die Identifikationsnummern der verschiedenen Glykane dar, die im Anhang 6.5 aufgeführt sind. Das CFG-Profil mit unverdünntem Protein wurde bei einer Proteinkonzentration von 200 µg/ml aufgenommen, und das mit verdünntem Protein bei einer Proteinkonzentration von 20 µg/ml. Die Bindungsaffinität zu den einzelnen Glykanen spiegelt sich in den verschiedenen Fluoreszenzintensitäten (RFU) wieder. Die Bindungsspezifitätsprofile von Epa9A, Epa12A und Epa23A, die mit geringeren Proteinkonzentrationen gemessen wurden befinden sich im Anhang (Abbildung 68).

2.3.7 Klassifizierung anhand terminaler Glykanstrukturen

Um festzustellen, inwieweit sich die Spezifitätsprofile durch Verringerung der Konzentration verändern, wurden wie zuvor Ligandenbindungsprofile unter Berücksichtigung terminaler Galactoside erstellt (Abbildung 27).

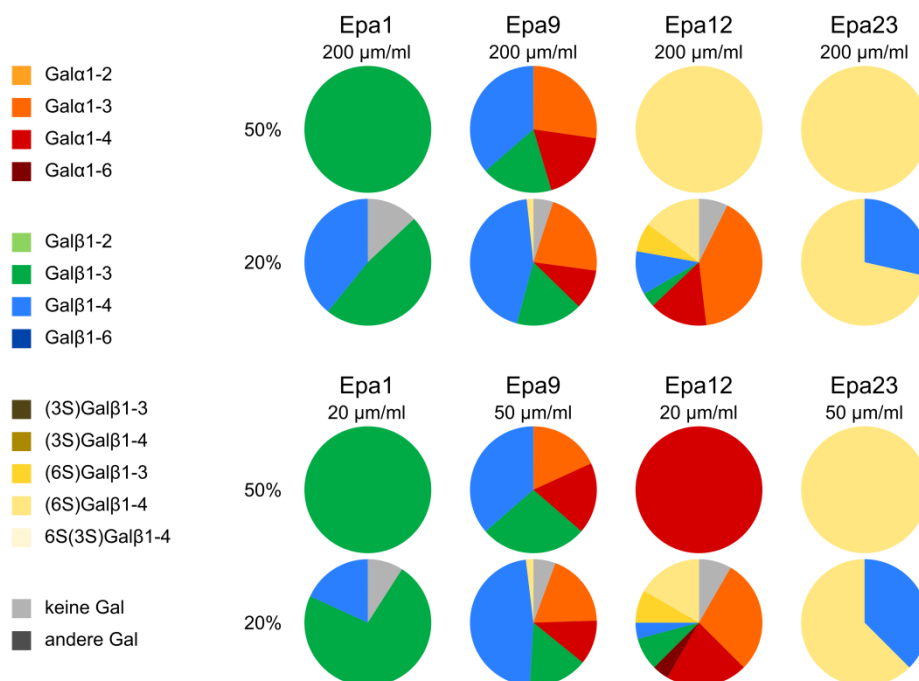


Abbildung 27: Ligandenbindungsprofile der EpaA-Domänen bei verschiedenen Proteinkonzentrationen unter Berücksichtigung terminaler Galactoside.

Die Tortendiagramme repräsentieren die Bindung zu verschiedenen terminalen Galactosid-Klassen, die eine relative Fluoreszenzintensität von $\geq 20\%$ oder $\geq 50\%$ der Fluoreszenzintensität des bestgebundenen Liganden aufweisen (Tabelle 45 und Tabelle 46). Es wurden ausschließlich verzweigte Glykan-Liganden berücksichtigt, die sich eindeutig einer Gruppe von terminalen Galactosiden und der darauffolgenden Verknüpfung zuordnen lassen. Der Farbcode für die unterschiedlichen Galactosid-Typen ist neben den Tortendiagrammen abgebildet.

Diese Analyse zeigt, dass sich die Profile, die mit einer Proteinkonzentration von $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ gemessen wurden, kaum von den Spezifitätsprofilen unterscheiden, die bei einer Konzentration von $200\text{ }\mu\text{g/ml}$ erstellt wurden (Epa9A und Epa23A). Bei einer zehnfachen Verringerung der Proteinkonzentration hingegen, kann für Epa1A eine verstärkte Spezifität zu $\beta 1$ -3-verknüpften Galactosiden ermittelt werden. Im Fall von Epa12A sehen sich die Profile, die mit Proteinkonzentrationen von $200\text{ }\mu\text{g/ml}$ und $20\text{ }\mu\text{g/ml}$ erstellt wurden, bei Betrachtung der 20% Grenze sehr ähnlich. Für die 50% Grenze kann hingegen eine klare Verschiebung zu $\text{Gal}\alpha 1$ -4-verknüpften terminalen Galactosiden beobachtet werden, was dafür spricht, dass Epa12A $\text{Gal}\alpha 1$ -4-Verknüpfungen bevorzugt bindet.

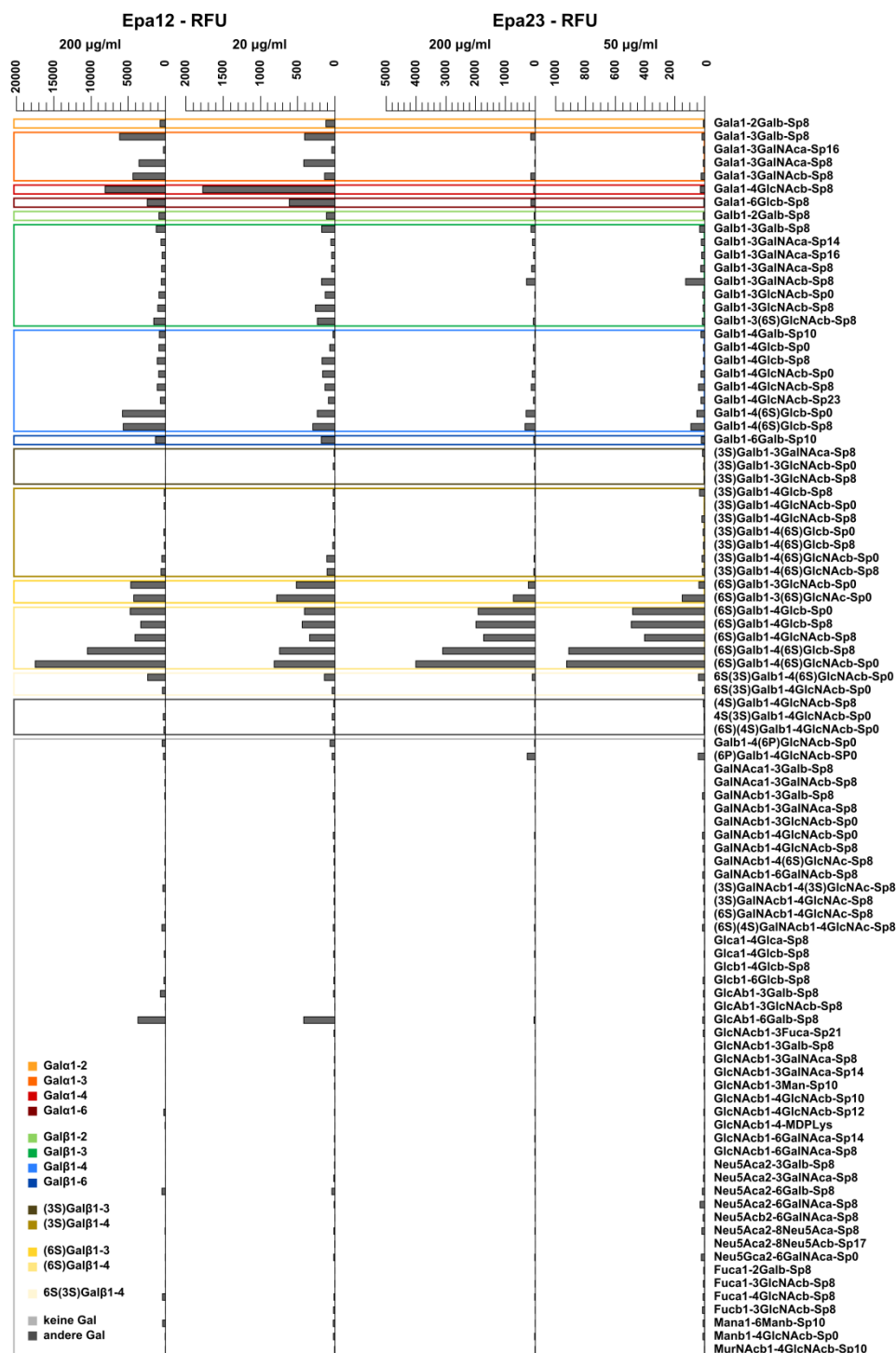


Abbildung 29: Bindung von Disacchariden durch Epa12A und Epa23A bei verschiedenen Proteinkonzentrationen.

Bindungsprofile aus Abbildung 28 und Abbildung 29 wurden durch Untersuchung der Bindung von Epa1A und Epa9A sowie von Epa12A und Epa23A an alle 94 Disaccharide, die auf dem Glykan-Chip MPA V5.1 präsentiert werden, erhalten. Die verschiedenen Galactosid-Typen sind durch unterschiedlich farbige Boxen hervorgehoben. Die Bindungsaffinität zu den einzelnen Disacchariden spiegelt sich in der Höhe der relativen Fluoreszenz wider. Die Werte entsprechen den Fluoreszenzintensitäten, die mit Proteinkonzentrationen von 200 µg/ml oder 50 µg/ml bzw. 20 µg/ml erhalten wurden.

Anhand der Bindung von Disacchariden können keine Unterschiede zwischen den Spezifitätsprofilen von Epa9A und Epa23A bei unterschiedlichen Proteinkonzentrationen ermittelt werden. Dies lässt sich vermutlich darauf zurückführen, dass die Profile lediglich bei einer vierfach geringeren Proteinkonzentration erstellt wurden. Epa1A, das bei einer Proteinkonzentration von 20 µg/ml gemessen wurde, zeigt eine spezifischere Bindung zu Disacchariden mit terminaler β 1-3-verknüpften Galactose. Ein ähnliches Bild zeigt sich bei Betrachtung des Profils von Epa12A bei zehnfach geringerer Proteinkonzentration, da ausschließlich Disaccharide mit terminaler sulfatierter oder α -verknüpfter Galactose gebunden werden (Abbildung 28, Abbildung 29). Interessanterweise bindet Epa12A bei niedrigeren Proteinkonzentrationen bevorzugt α -verknüpfte Galactose, was zum jetzigen Zeitpunkt nicht erklärt werden kann. Normalerweise wäre bei geringeren Proteinkonzentrationen lediglich eine bevorzugte Bindung sulfatierter Galactoside zu erwarten.

2.4 Biochemische Bestimmung der Ligandenbindungskonstanten von EpaA-Domänen bei der Bindung an verschiedenen Galactosiden

2.4.1 Quantifizierung der Bindung von Epa1A, Epa7A, Epa3A, Epa22A, Epa6A, Epa12A und Epa23A an das T-Antigen

Anhand der CFG-Analysen konnten Informationen bezüglich der Ligandenspezifität der einzelnen EpaA-Domänen erhalten werden, indem die relative Adhäsion zu einer Vielzahl putativer Liganden bestimmt wurde. Dabei handelt es sich jedoch lediglich um semi-quantitative Daten, sodass daraus keine exakten Bindungskonstanten (K_D) anhand der Fluoreszenzintensitäten abgeleitet werden können. Um quantitative Aussagen bezüglich der Ligandenaffinitäten treffen zu können, wurden anschließend Fluoreszenztitrationsanalysen mit Epa1A, Epa6A, Epa7A, Epa3A, Epa12A, Epa22A und Epa23A durchgeführt, um die Bindung an das T-Antigen zu untersuchen. Das T-Antigen ist auch als *Core 1 Mucin-type O-Glycan* bekannt und häufig über sein reduktives Ende, bestehend aus *N*-Acetyl-Galactosamin, an Serin- oder Threoninreste der VNTR-Region von Mucinen gebunden. Dadurch ist es häufig auf der Oberfläche menschlicher Epithelzellen lokalisiert und bietet den GPI-verankerten Lektinen, die auf der Oberfläche von *C. glabrata* präsentiert werden, ein gutes Adhäsionsziel. Ziel der

Bestimmung von Bindungskonstanten war es, einen quantitativen Vergleich der Bindungsstärken, die durch die verschiedenen EpaA-Domänen vermittelt werden, zu ermöglichen. Dazu wurden Tyrosin- und Tryptophanreste in der Nähe der Bindungstasche bei einer Wellenlänge von 280 nm als intrinsische Fluorophore angeregt. Anschließend wurde das Emissionsmaximum, welches sich je nach Protein zwischen 340 bis 350 nm befand, während der Zugabe verschiedener Ligandenmengen ermittelt. Der dabei resultierende Fluoreszenzquench wurde nachfolgend gegen die Konzentration an eingesetztem Substrat aufgetragen, sodass anhand der dabei ermittelten Kurven die zugehörigen Bindungskonstanten bestimmt werden konnten (Abbildung 70). Alle Messreihen wurden dreimal wiederholt und anschließend das arithmetische Mittel und der dazugehörigen Standardfehler ermittelt. Aufgrund der geringen Menge an Substrat konnte die Fluoreszenztitration für Epa12A, Epa22A und Epa23A nur einmal durchgeführt werden (Abbildung 30).

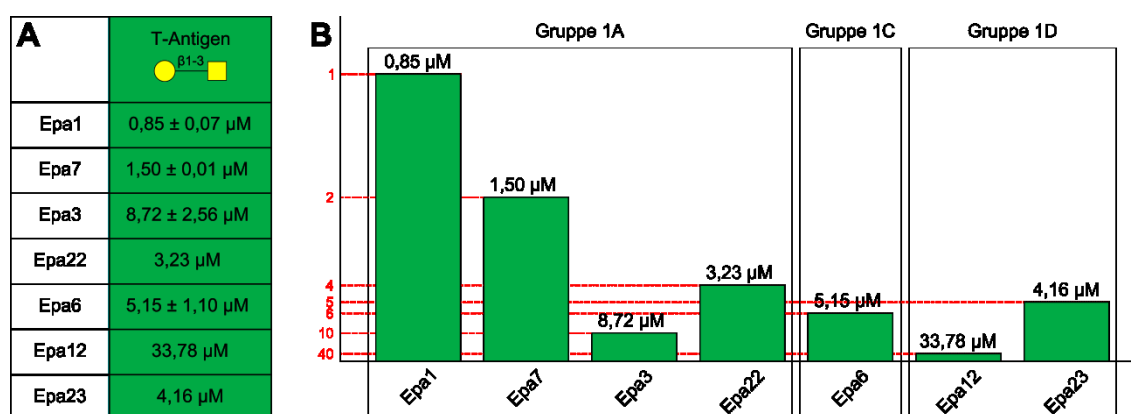


Abbildung 30: Bindungsstärken zwischen den A-Domänen von Epa1, Epa7, Epa3, Epa22, Epa6, Epa12 und Epa23 und dem T-Antigen.

A) Neben den Bindungskonstanten ist der dazugehörige Standardfehler aufgeführt. Das T-Antigen ist gemäß der CFG-Nomenklatur dargestellt. Die Farbliche Unterlegung entspricht dem Farbcode der unterschiedlichen Galactosid-Klassen. B) Vergleich der vermittelten Bindungsstärken. Die rot gestrichelten Linie und die dazugehörigen Werte geben an, um wie viel schwächer die Bindung im Vergleich zur Epa1A-Domäne ist, für die die stärkste Bindung an das T-Antigen gemessen wurde.

Epa1A vermittelt mit einem K_D -Wert von 0,85 μM die stärkste Bindung zum T-Antigen. Auch Epa7A, welches wie Epa1A zur Gruppe 1A zählt, deren Mitglieder bevorzugt β 1-3-verknüpfte Galactoside binden, vermittelt eine starke Adhäsion, die Bindungskonstante beträgt 1,50 μM . Epa3A und Epa22A zählen ebenfalls zur Gruppe 1A und binden bevorzugt β 1-3-verknüpfte Galactoside. Dabei vermittelt Epa3A eine Bindung von 8,72 μM , was 10 mal schwächer als die Adhäsion von Epa1A ist. Epa22A, für das ein K_D -Wert von 3,23 μM gemessen wurde, vermittelt eine im

Vergleich zu Epa1A 4-fach geringere Adhäsion. Durch die Analyse der strukturbasierten Phylogenie konnte bereits eine entferntere Verwandtschaft von Epa3A und Epa22A zur Epa1-Untergruppe ermittelt werden, was die schwächere Bindung erklären könnte (Abbildung 13). Für Epa9A (Gruppe 1B) konnte keine Bindungskonstante bestimmt werden, da das Emissionsmaximum weiter in den kürzerwelligen Bereich verschoben war und von einem weiteren Emissionssignal überlagert wurde. Für Epa6A (Gruppe 1C) wurde ein K_D -Wert von 5,15 μ M gemessen werden, sodass Epa6A das T-Antigen 6-fach geringer als Epa1A bindet. Anhand der CFG-Analysen zeigte sich jedoch bereits, dass Mitglieder der Gruppe 1C α -verknüpfte Galactoside bevorzugt binden. Epa12A bindet das T-Antigen 40-fach schwächer als Epa1A und für Epa23A konnte eine 5-fach schwächere Bindung ermittelt werden. Diese EpaA-Domänen zählen jedoch zur Gruppe 1D, deren Mitglieder auf das Binden sulfatierter Galactoside spezialisiert sind. Da die EpaA-Domänen der Gruppe 2 nur in sehr geringen Ausbeuten gewonnen wurden, konnten keine Bindungskonstanten bestimmt werden.

2.4.2 Bestimmung der Ligandenbindungskonstanten von Epa1A, Epa7A und Epa6A bei der Bindung an verschiedene Galactoside

Weiterhin sollte die Affinität von Epa1A, Epa6A und Epa7A zu unterschiedlich verknüpften Galactosiden bestimmt werden, die im Anschluss in Zusammenhang mit den Bindungsspezifitätsprofilen gebracht werden können. Dadurch wird letztendlich das Verständnis für bindungsvermittelnde Bereiche der Epa-Familie erweitert. Hierzu wurden die A-Domänen von Epa1, Epa6 und Epa7 gegen fünf verschiedene Disaccharide mit einheitlichem, terminalem Galactoserest aber unterschiedlicher Verknüpfung oder variierendem, sekundärem Glykan titriert (Abbildung 31). Auch hier lagen alle gemessenen Ligandenbindungskonstanten im mikromolaren Bereich. Epa1A und Epa7A, die aufgrund der CFG-Profile und der strukturbasierten Phylogenie in eine Gruppe geordnet wurden, zeigen wie erwartet hohe Affinitäten zum T-Antigen und zu β 1-3 Galactobiose. Lacto-*N*-biose, welche als SekundärGlykan GlcNAc trägt, wird von beiden deutlich schwächer gebunden. Die schwächere Bindung lässt sich wahrscheinlich auf eine geringere Stabilisierung oder sterische Hinderung innerhalb der Bindungstasche zurückführen. Auch α - und β 1-4-verknüpfte Disaccharide mit terminalem Galactoserest werden sowohl von Epa1A als auch von Epa7A deutlich schwächer als der bevorzugte Ligand gebunden. Beide EpaA-Domänen zeigen ein

ähnliches Bindungsprofil, wobei Epa7A zwar eine schwächere Adhäsion dafür aber eine höhere Spezifität vermittelt.






	<div><div><div>Galα1-3</div><div>Galβ1-3</div><div>Galβ1-4</div></div><div><div>α1-3</div><div></div></div></div>	<div><div>β1-3 Galactobiose</div><div><div>β1-3</div><div></div></div></div>	<div><div>T-Antigen</div><div><div>β1-3</div><div></div></div></div>	<div><div>Lacto-<i>N</i>-biose</div><div><div>β1-3</div><div></div></div></div>	<div><div><i>N</i>-Acetyl-D-lactosamin</div><div><div>β1-4</div><div></div></div></div>
Epa1	5,04 ± 0,94 μM	0,90 ± 0,05 μM	0,85 ± 0,07 μM	4,92 ± 2,52 μM	1,98 ± 0,16 μM
Epa6	4,40 ± 0,68 μM	2,63 ± 0,23 μM	5,15 ± 1,10 μM	14,82 ± 0,07 μM	9,42 ± 1,28 μM
Epa7	12,36 ± 0,94 μM	1,32 ± 0,12 μM	1,50 ± 0,01 μM	14,72 ± 0,44 μM	4,76 ± 0,42 μM

Abbildung 31: Ermittelte Bindungskonstanten von Epa1A, Epa7A und Epa6A bei der Bindung an verschiedene Disaccharide.

Neben den Bindungskonstanten ist der dazugehörige Standardfehler aufgeführt. Die verschiedenen Glykanliganden sind gemäß der CFG-Nomenklatur dargestellt. Die Farbliche Unterlegung entspricht dem Farbcode der unterschiedlichen Galactosid-Klassen.

Für Epa6A konnten, außer bei der Bindung von Lacto-N-biose, Bindungskonstanten im einstelligen mikromolaren Bereich gemessen werden. Epa6A vermittelt einen K_D -Wert von 5.15 μ M zum T-Antigen, jedoch ist die Diskriminierung zwischen den einzelnen Disaccharidliganden deutlich geringer als für Epa1A und Epa7A beobachtet. Zudem vermittelt Epa6A zu α 1-3 Galactobiose wie erwartet eine stärkere Bindung als Epa1A und Epa7A.

In einem letzten Schritt sollten noch die mittels Fluoreszenztitration gemessenen Werte mit den Daten der CFG-Analyse verglichen werden, um zu überprüfen, ob die erhaltenen Daten übereinstimmen (Abbildung 32).

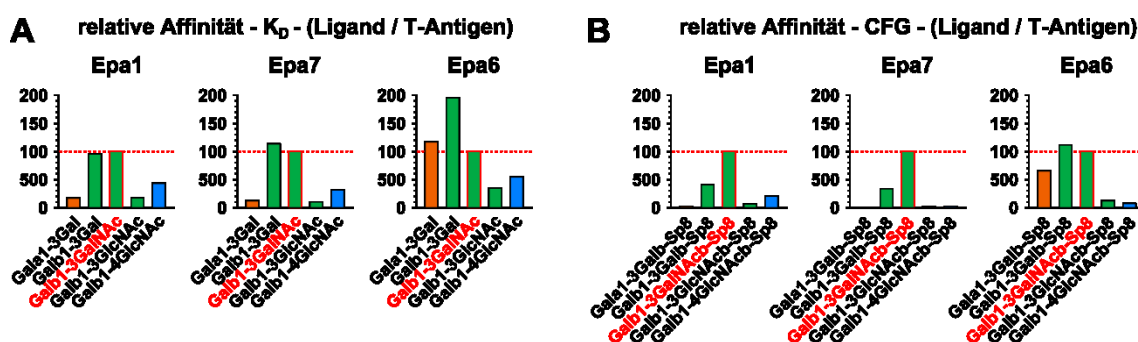


Abbildung 32: Vergleich der mittels Fluoreszenztitration und Glykan-Array gemessenen, relativen Bindungsaffinitäten von Epa1A, Epa7A und Epa6A an verschiedenen Liganden.

Die erhaltenen Werte wurden auf die Bindung der jeweiligen EpaA-Domänen an das T-Antigen (Gal β 1-3GalNAc) normiert, welche auf 100 % Bindung gesetzt wurde. Der Farbcode entspricht den unterschiedlichen Galactosid-Klassen. Die rot gestrichelte Linie gibt eine relative Affinität von 100 % an.

Dabei zeigt sich, dass bei beiden Analysen vergleichbare Bindungsprofile erhalten wurden. So konnte für Epa1A und Epa7A bei beiden Analysen Galactose mit einer β 1-3-Verknüpfung zu einem weiteren Galactoserest als bevorzugter Ligand identifiziert werden. Auch für Epa6A lässt sich anhand der beiden Analysemethoden feststellen, dass Gal β 1-3Gal der bevorzugte Ligand ist und eine geringere Diskriminierung zwischen den weiteren Disaccharidliganden vermittelt wird. Ansonsten fällt auf, dass mittels Fluoreszenztitration geringere Unterschiede der relativen Affinität zwischen den einzelnen Disacchariden gemessen werden. So bindet Epa1A das T-Antigen bei beiden Messmethoden am stärksten, gefolgt von β 1-3 Galactobiose und *N*-Acetyl-D-lactosamin. Bei der Fluoreszenztitration wurde jedoch an *N*-Acetyl-D-lactosamin eine halb so starke Bindung wie an das T-Antigen gemessen, wohingegen derselbe Ligand gemäß der CFG-Analysen 5-fach schwächer gebunden wird. Die geringere Unterscheidung der relativen Affinitäten zwischen den beiden Messmethoden könnte sich beispielsweise dadurch erklären, dass der Ligand bei der Fluoreszenztitration in freier Form vorliegt, während er bei den CFG-Arrays auf dem Glas-Chip in fixierter Form vorliegt. Die Spezifitäten der einzelnen EpaA-Domänen lassen sich demnach sehr gut mittels *Glycan Array Screening* bestimmen, jedoch können keine weiteren Ligandenbindungskonstanten durch Normierung auf einen gemessenen Wert bestimmt werden.

2.5 Kristallographische Untersuchungen von Epa6A und Epa9A

2.5.1 Kristallisation, Datensammlung, Prozessierung, Phasenlösung, Modellierung und Verfeinerung

Mittels Röntgenstrukturanalyse ist es möglich die dreidimensionale Struktur eines Proteins zu ermitteln und so Aussagen über Aufbau und Funktion machen zu können, wozu auch die Interaktion mit Liganden zählt. Der erste Schritt in Richtung einer Strukturlösung besteht in der Kristallisation des zu untersuchenden Proteins. Durch eine regelmäßige Anordnung der Proteine im Kristallgitter ist es möglich Beugungsexperimente am Kristall durchzuführen. Mit den erhaltenen Beugungsmustern kann die proteinumhüllende Elektronendichte berechnet werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Kristallisationsscreens mit den A-Domänen von Epa3, Epa6, Epa7, Epa9, Epa12, Epa19 und Epa23 angesetzt (Abschnitt 5.4.1). Dabei konnte unter verschiedenen Bedingungen Kristallwachstum beobachtet werden, woraufhin Reproduktions- und Optimierungsscreens angesetzt wurden, um weitere gut streuende Proteinkristalle zu erhalten (Abschnitt 5.4.2). Dies gelang für die A-Domänen von Epa6 und Epa9, deren Strukturlösung von Michael Kock durchgeführt wurde (Abschnitt 5.4). Nachdem die Röntgenbeugungsdaten aufgenommen, reduziert und skaliert worden waren, wurde molekularer Ersatz anhand Epa1A-Struktur durchgeführt. Die Epa1A-Struktur wurde gewählt, da Epa6A und Epa9A eine hohe Sequenzidentität zu Epa1A zeigen und in dieselbe Multigenfamilie eingeordnet werden. Hierzu wurde zunächst ein Modell der Epa1A-Struktur generiert, bei dem die hypervariablen Schleifen L1, L2 und L3, sowie der N- und C-Terminus abgeschnitten wurden. Anschließend wurde ein molekularer Ersatz in Kombination von *Phaser* und *AutoMR* der *Phenix-suite* durchgeführt, wobei für Epa6A eine Lösung in Raumgruppe $P2_12_12_1$ und für Epa9A eine in $P3_12_1$ gefunden wurde (McCoy, *et al.*, 2007). Nach Inspektion der Elektronendichte folgte *model-building* in *Autobuild* (*Phenix suite*). Nach weiterer Verfeinerung der Modelle konnten die gebundenen Glykan-Liganden identifiziert und in die jeweiligen Strukturen von Epa6A und Epa9A integriert werden. Die zugehörigen Datensammlungs- und Verfeinerungsstatistiken (Abschnitt 6.9) sowie die getesteten Kristallisationsscreens und die Bedingungen aus denen die Proteinkristalle entnommen wurden (Abschnitt 6.8) sind im Anhang aufgeführt (Abschnitt 5.4).

2.5.2 Strukturanalyse

Epa6A und Epa9A zeigen als Hauptfaltungsmotiv ein PA14-ähnliches β -Sandwich, an dessen Ausbildung 13 der beobachteten 15 β -Faltblattstränge beteiligt sind (Abbildung 33). Die Bindungstasche setzt sich, wie auch bei Epa1A, aus der CBL1 und CBL2-Region sowie den drei Schleifen L1, L2 und L3 zusammen. In beiden Bindungstaschen konnte ein Calciumion und ein Lactosemolekül identifiziert werden, unter deren Anwesenheit kristallisiert wurde. Zwischen den beiden Asparaginsäureresten des CBL1 kann bei beiden Strukturen eine *cis*-Verknüpfung beobachtet werden, welche wie bei Epa1A und Flo5A als *DcisD*-Motiv bezeichnet wird.

Das *DcisD*-Motiv und ein Asparaginrest (N225 oder N256) in CBL2 sind an der Komplexierung des Calciumions beteiligt.

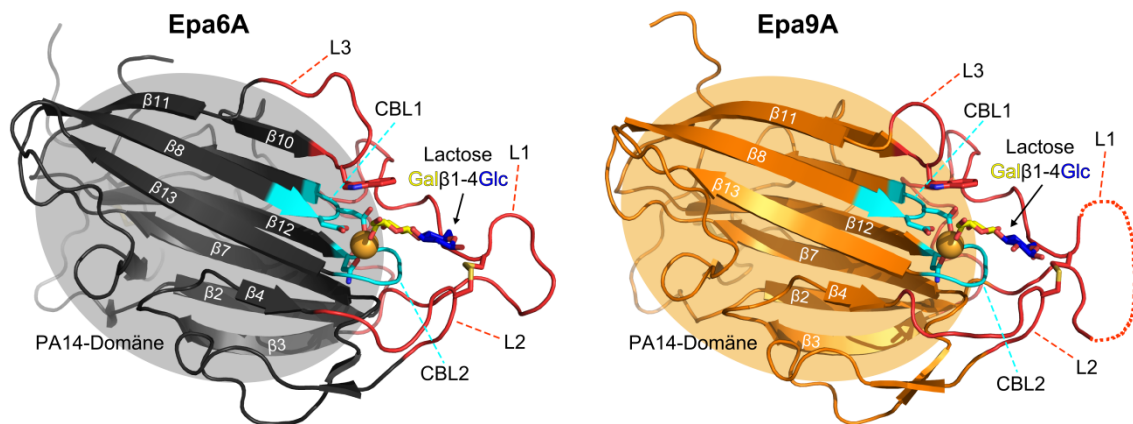


Abbildung 33: Proteinstrukturen der A-Domänen von Epa6 und Epa9.

Die atomaren Strukturen von Epa6A (links, Dunkelgrau) und Epa9A (rechts, Orange). Die PA14-Domäne ist bei beiden farblich unterlegt. Das Calciumion ist in Orange dargestellt und befindet sich im Inneren der Bindungstasche. Die beiden Schleifen CBL1 und CBL2 sind in Cyan dargestellt, wohingegen die Schleifen L1, L2 und L3 rötlich hervorgehoben sind. In beiden Strukturen kann Lactose als Ligand (Gal β 1-4Glc) beobachtet werden, wobei die Galactose gemäß CFG-Nomenklatur in Gelb und die Glucose in Blau dargestellt ist.

Zudem kann der Tryptophanrest (W198 oder W230) der L3 Schleife innerhalb der Bindungstasche beobachtet werden, der voraussichtlich die Bindung terminaler Galactoside durch hydrophobe Wechselwirkungen stabilisiert (Abbildung 34, Abbildung 35). Auch für Epa6A und Epa9A konnte anhand der CFG-Analysen gezeigt werden, dass sie bevorzugt terminale Galactoside binden. Basierend auf den Ergebnissen der CFG-Analysen konnten gezielt bevorzugt gebundene Disaccharide mit terminalem Galactoserest ausgewählt werden, die nachfolgend in die erzeugten Proteinkristalle von Epa6A und Epa9A *gesoakt* wurden (α 1-3 Galactobiose, β 1-3 Galactobiose, T-Antigen, Lacto-*N*-biose und *N*-Acetyl-D-lactosamin) (Abbildung 34, Abbildung 35, Abschnitt 5.4.4). Anhand der gelösten Strukturen lassen sich Aussagen über Orientierung und Stabilisierung der gebundenen Glykanliganden treffen. Diese Ergebnisse können anschließend mit den ermittelten Bindungskonstanten und den gemessenen relativen Affinitäten an Disaccharide in Verbindung gebracht werden, wodurch ein besseres Verständnis der spezifitätsvermittelnden Bereiche der EpaA-Domänen ermöglicht wird (Abbildung 22, Abbildung 30). Zunächst lässt sich feststellen, dass das Calciumion innerhalb der Bindungstasche von Epa6A und Epa9A durch das *DcisD*-Motiv (CBL2), den Asparaginrest (N225 bzw. N256) und die Carbonyl-Gruppen der Peptidbindungen des CBL2 komplexiert wird.

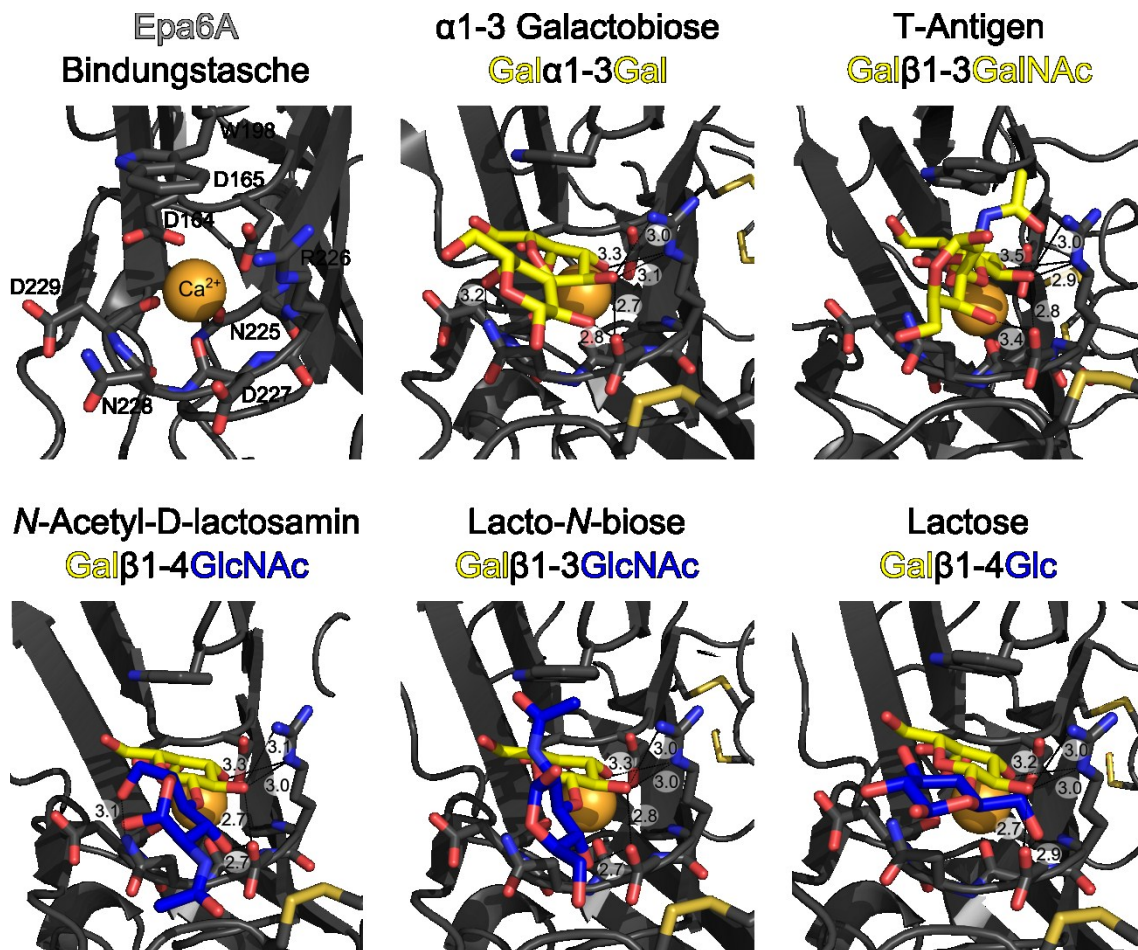


Abbildung 34: Bindungstasche von Epa6A mit verschiedenen gebundenen Liganden.

Die innere Bindungstasche von Epa6A ist zusammen mit verschiedenen Liganden abgebildet. Das *DcisD*-Motiv, das Asparagin an erster Stelle der CBL2-Region, sowie das Peptidrückgrat stabilisieren das Calciumion, welches die Substratbindung vermittelt. Die verschiedenen Liganden sind gemäß CFG Nomenklatur abgebildet. Die CBL2-Region ist bei allen Bindungstaschen in Stabdarstellung gezeigt. Die Koordinationen der verschiedenen Liganden mit den Aminosäureresten sind durch gestrichelte Linien gekennzeichnet, wobei die zugehörigen Abstände in Ångström angegeben sind. Die Datensammlungs- und Verfeinerungsstatistiken zu diesen Modellen befinden sich in Anhang 6.9.

Des Weiteren vermitteln beide EpaA-Domänen vergleichbare Protein-Ligand-Interaktionen zum terminalen Galactoserest, wie bereits für Epa1A beobachtet. Dabei wird das Calciumion durch die 3- und 4-Hydroxylgruppe der terminalen Galactose koordiniert. Zudem ist eine hydrophobe Stabilisierung der terminalen Galactose durch den Tryptophanrest in L3 gewährleistet. Bei beiden A-Domänen befindet sich ein Arginin an derselben Position in CBL2 (R226 und R257), welcher mit der 2- und 3-Hydroxylgruppe der terminalen Galactose interagiert. Auf das Arginin folgt in beiden EpaA-Domänen ein Asparaginsäurerest (D227 und D258), der sowohl mit dem terminalen als auch dem sekundären Glykanrest interagiert.

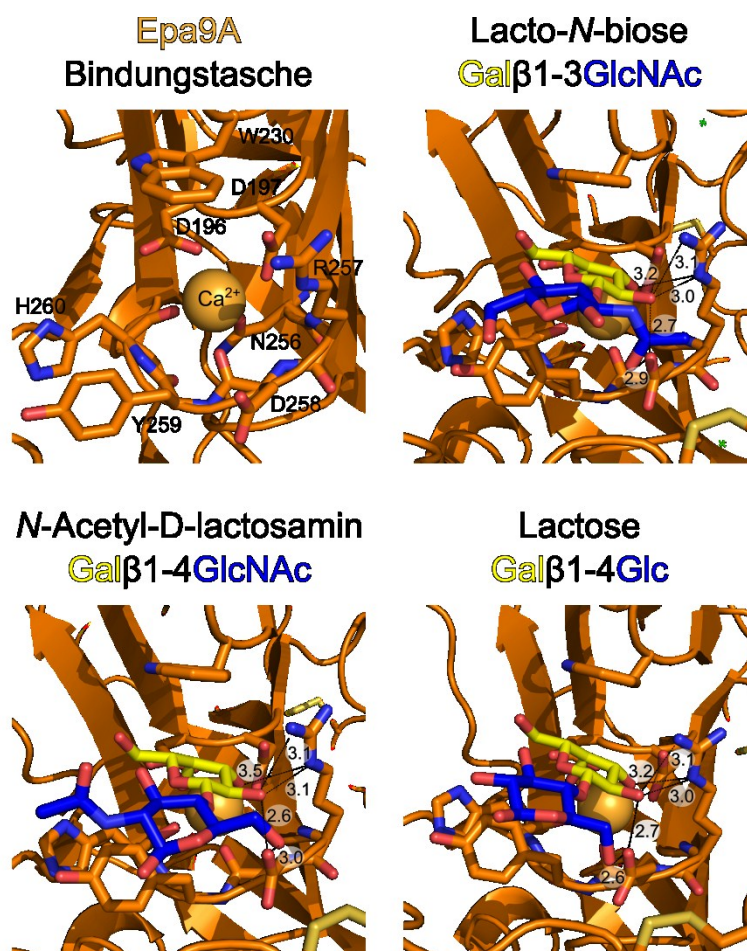


Abbildung 35: Bindungstasche von Epa9A mit verschiedenen gebundenen Liganden.

Die innere Bindungstasche von Epa9A ist zusammen mit verschiedenen Liganden abgebildet. Das *DisD*-Motiv, das Asparagin an erster Stelle der CBL2-Region, sowie das Peptidrückgrat stabilisieren das Calciumion, welches die Substratbindung vermittelt. Die verschiedenen Liganden sind gemäß CFG-Nomenklatur abgebildet. Die CBL2-Region ist bei allen Bindungstaschen in Stabdarstellung gezeigt. Die Koordinationen der verschiedenen Liganden mit den Aminosäureresten sind durch gestrichelte Linien gekennzeichnet, wobei die zugehörigen Abstände in Ångström angegeben sind. Die Datensammlungs- und Verfeinerungsstatistiken zu diesen Modellen befinden sich in Anhang 6.9.

Ansonsten unterscheiden sich die beiden Bindungstaschen deutlich voneinander. So sind im Falle von Epa6A, mit einem Asparagin an Position 228 und einer Asparaginsäure an Position 229, zwei sterisch wenig beanspruchende Aminosäuren innerhalb der Bindungstasche lokalisiert. Die größere Bindungstasche könnte die geringere Diskriminierung der Bindung an verschiedenen Disacchariden erklären, die mittels Fluoreszenztitration beobachtet wurde. Epa9A weist an diesen Positionen, mit einem Tyrosin (Y259) und einem Histidin (H260), zwei räumlich beanspruchende Aminosäuren auf. Anhand der unterschiedlichen Aminosäuren an den beiden letzten Positionen der CBL2-Region könnte sich die unterschiedliche Orientierung des zweiten Glykanrests innerhalb der Bindungstasche der beiden EpaA-Domänen erklären lassen.

Des Weiteren weisen beide A-Domänen eine unterschiedliche Ladung innerhalb der Bindungstasche auf. So ist die Bindungstasche von Epa6A durch die Asparaginsäure (D229) an der letzten Position der CBL2-Region partiell negativ geladen, wohingegen im Falle von Epa9A mit einem Histidin (H260) eine positive Ladung an dieser Position lokalisiert ist. Dies könnte im Falle von Epa9A die bevorzugte Bindung von sulfatierten Galactosiden erklären.

2.6 Funktionelle Analyse der Adhäsion von EpaA-Domänen *in vivo* mit *S. cerevisiae* als Modellorganismus

2.6.1 Herstellung von *S. cerevisiae* Stämmen, die einzelne EpaA-Domänen auf ihre Oberfläche präsentieren

Neben den biochemischen *in vitro* Untersuchungen wurden *in vivo* Untersuchungen mit den EpaA-Domänen durchgeführt. Um die Funktion der einzelnen EpaA-Domänen von *C. glabrata* zu ermitteln, müssen diese separat analysiert werden. Da *C. glabrata* CBS138 jedoch 17 verschiedene Mitglieder der Epa-Familie aufweist, ist es sehr schwierig einen *C. glabrata* Stamm herzustellen, welcher nur ein Epa-Adhäsion produziert. Zum einen müssten 17 Stämme hergestellt werden, bei denen je 16 *EPA*-Gene deletiert sind, um zu gewährleisten dass nur ein Epa-Protein exprimiert wird. Da die *EPA*-Gene subtelomer lokalisiert sind und ihre Expression komplex reguliert ist, müssten zudem geeignete Bedingungen gefunden werden, sodass das zu untersuchende Protein auch an der Oberfläche präsentiert wird. Um dann noch das Adhäsionsverhalten aller Epa-Proteine miteinander vergleichen zu können, müsste eine gemeinsame Bedingung gefunden werden, welche eine gleichmäßige Expression der *EPA*-Gene für alle Stämme sicherstellt. Da dies jedoch kaum realisierbar ist, wurde das Problem in Ansatz gewählt, bei dem *S. cerevisiae* Stämme hergestellt wurden, welche jeweils eine der 17 EpaA-Domänen auf ihrer Oberfläche präsentieren (Abschnitt 5.5.1 bis Abschnitt 5.5.5). *S. cerevisiae* eignet sich in diesem Fall besonders gut als heterologes Expressionssystem, da die Bäckerhefe sehr nah mit *C. glabrata* verwandt ist aber keine EpaA-Domänen besitzt. Zudem lässt sich die Bäckerhefe einfach kultivieren und ist im Gegensatz zu *C. glabrata* kein humanpathogener Organismus. Um die verschiedenen EpaA-Domänen in *S. cerevisiae* herzustellen, und anschließend die durch sie vermittelte Adhäsion an Epithelzellen und abiotischen Oberflächen zu untersuchen, wurden die

verschiedenen *EPAA*-Domänen jeweils in den Centromer-Vektor BHUM2157 inseriert und auf diesem Weg mit der *FLO11BC*-Domäne fusioniert. Gleichzeitig wurden sie mit einem einheitlichen Sekretionssignal (*FLO11^{AS1-30}*) und einem 3HA-Epitop (*3HA*) verknüpft und unter Kontrolle des konstitutiven *PGK1*-Promotors gebracht (Abschnitt 5.5.2). Die BC-Domäne von *FLO11* wurde als Träger der EpaA-Domänen gewählt, da ausschließlich die Adhäsion, welche durch die EpaA-Domänen vermittelt wird, beobachtet werden sollte. Flo11 aus *S. cerevisiae* ist ein Homolog zu den Epa-Proteinen aus *C. glabrata*, und zählt ebenfalls zu den GPI-verankerten Zellwandproteinen, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die Flo11BC-Domäne vergleichbare Funktionen wie die BC-Domänen der Epa-Proteine hat. Anschließend wurden die hergestellten Expressionsplasmide jeweils in den *S. cerevisiae* Stamm BY4741 transformiert, der kein Flo11 Flokkulin produziert, wodurch ein Adhären der Zellen aneinander verhindert wird und somit eine quantitative Analyse der Zellzahl möglich ist (Abschnitt 5.5.3). Mittels Immunfluoreszenzmikroskopie wurde anschließend überprüft, ob alle *S. cerevisiae* Zellen das entsprechende Fusionsprotein an der Oberfläche präsentierten, was bei allen hergestellten Stämmen der Fall war (Abschnitt 5.5.5).

2.6.2 Adhäsion der EpaA-Domänen an Epithelzellen

Menschliche Epithelzellen gelten als natürliches Habitat von *C. glabrata* (Cormack, *et al.*, 1999). Glykanstrukturen auf der Oberfläche von Epithelzellen, beispielsweise in Form der hoch O-glykosylierten Mucine, sind als Liganden der Epa-Proteine bekannt (Zupancic, *et al.*, 2008). Dies führt zu einer Besiedlung des Wirts mit *C. glabrata*, welche durch die Epa-Proteine ermöglicht wird. Um die Adhäsion der Epa-Proteine an Epithelzellen *in vivo* zu untersuchen, wurden Adhäsionstests mit den hergestellten *S. cerevisiae* Stämmen, welche die verschiedenen EpaA-Domänen auf ihrer Oberfläche präsentieren, an Caco-2 Darmkrebsepithelzellen durchgeführt. Diese Zelllinie besitzt eine große Menge an T-Antigen präsentierenden Glykanstrukturen auf ihrer Oberfläche. Das T-Antigen wird von einigen EpaA-Domänen gut gebunden, was in dieser Arbeit bereits mittels *Glycan Array Screening* und Fluoreszenztitration nachgewiesen werden konnte (Abbildung 21, Abbildung 22, Abbildung 23, Abbildung 30). Aus diesem Grund kann man die Adhäsion an Caco-2 Zellen gut mit den bereits durchgeführten *in vitro* Messungen vergleichen. Um sicher zu stellen, dass die Bindung ausschließlich durch die EpaA-Domäne vermittelt wird, wurden verschiedene Kontrollen durchgeführt.

Diese umfassen zum einen *S. cerevisiae* Zellen, welche das Plasmid YCplac33 tragen und somit keine zusätzlichen Proteine an ihrer Oberfläche präsentieren. Zudem wurden *S. cerevisiae* Zellen als Kontrolle verwendet, die das HA-Epitop und die Flo11BC-Domäne, jedoch keine EpaA-Domäne exprimieren.

Um die Adhäsion der verschiedenen Hefestämme an Caco-2 Zellen zu untersuchen, wurde eine definierte Zellzahl der jeweiligen Stämme zu einer als Monolayer wachsenden Zellkultur aus Caco-2 Zellen gegeben (Abschnitt 5.5.6). Nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden, während der die Hefezellen an die Caco-2 Zellen adhäreren konnten, wurde das Zellkulturmedium mit den nicht adhärierenden *S. cerevisiae* Zellen abgenommen und auf einer YPD-Platte ausplattiert. Der Zellmonolayer wurde anschließend mit PBS-Puffer gewaschen, bevor er zusammen mit den eventuell adhärierenden Hefezellen in PBS-Puffer resuspendiert und ebenfalls auf einer YPD-Platte ausplattiert wurde. Nach einer zweitägigen Inkubation der Platten wurden gewachsene Hefekolonien quantifiziert, um dadurch Rückschlüsse auf die Adhäsion an Caco-2 Zellen zu ziehen (Abschnitt 5.5.7). Die so erhaltenen Ergebnisse wurden in Form von Balkendiagrammen dargestellt, welche die relative Adhäsion der verschiedenen EpaA-Domänen nach zwei Stunden abbilden. Dieser Zeitpunkt wurde gewählt, da anschließend keine weitere Zunahme der Adhäsion beobachtet werden konnte (Abbildung 36). Wie erwartet zeigt der *S. cerevisiae* Stamm, der weder eine EpaA-Domäne, noch das HA-Epitop oder die Flo11BC-Domäne exprimiert, keine Adhäsion an Caco-2 Zellen. Auch der *S. cerevisiae* Stamm, der zwar das HA-Epitop und die Flo11BC-Domäne exprimiert aber keine EpaA-Domäne, zeigt keine signifikante Adhäsion. Dies deutet darauf hin, dass weder das 3HA-Epitop noch die Flo11BC-Domäne Adhäsion an Caco-2 Zellen vermitteln. Die A-Domänen von Epa1, Epa6 und Epa7, welche mittels strukturbasierter Phylogenie in die Epa1-Untergruppe eingeordnet wurden, vermitteln hingegen eine starke Adhäsion an Caco-2 Zellen, wobei mindestens 50 % der ursprünglich zugegebenen *S. cerevisiae* Zellen, welche die A-Domänen von Epa1, Epa6 und Epa7 auf ihrer Oberfläche präsentieren, an den Epithelzellen haften blieben. Die Epa7A-Domäne vermittelt die höchste Adhäsion an Caco-2 Zellen, da 65 % der zugegebenen *S. cerevisiae* Zellen an den Epithelzellen hafteten, gefolgt von Epa1A, welche eine relative Adhäsion von 60 % vermittelt. Die relative Adhäsion, die durch die A-Domäne von Epa6 vermittelt wird, beträgt 50 %,

was zwar den niedrigsten Wert innerhalb der Epa1-Untergruppe darstellt, verglichen mit den anderen A-Domänen jedoch zu einer signifikant stärkeren Adhäsion beiträgt.

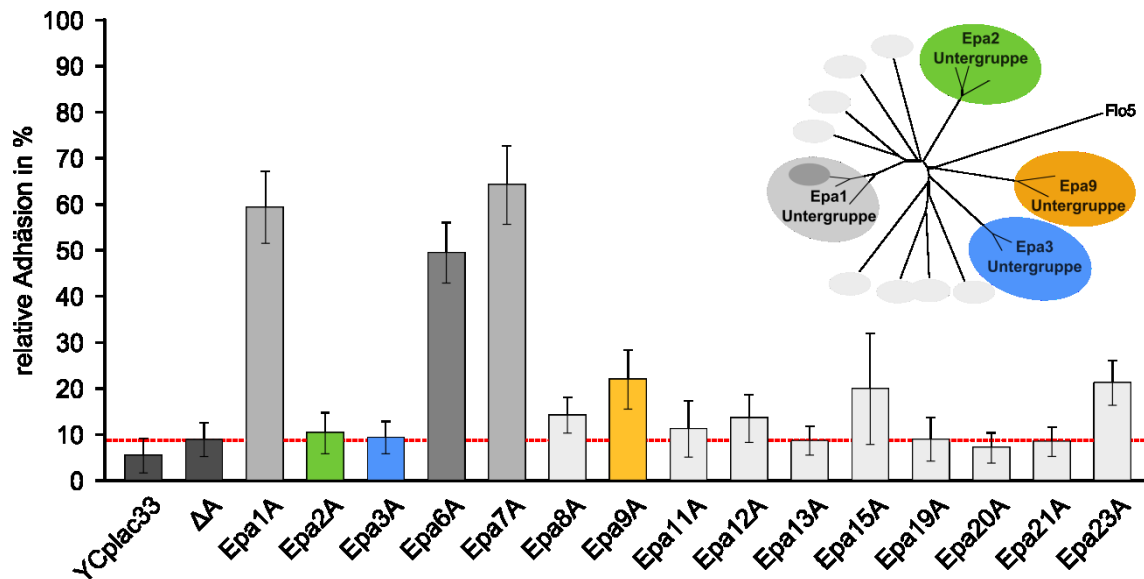


Abbildung 36: Relative Adhäsion der EpaA-Domänen an Caco-2 Epithelzellen nach zwei Stunden.

Die verschiedenen EpaA-Domänen sind mit der BC-Domäne von *FLO11* aus dem *S. cerevisiae* Stamm $\Sigma 1278b$ fusioniert und stehen unter Kontrolle des *PGK1*-Promotors. Als Plasmidrückgrat diente das *CEN*-Plasmid YCplac33 (B2445). Die hergestellten Konstrukte wurden in den *S. cerevisiae* Stamm YHUM0719 mit S288c-Stammhintergrund transformiert. Die erhaltenen Werte stellen die adhärierenden Zellen nach 2 Stunden im Verhältnis zur Gesamtmenge an Hefezellen dar. Als Kontrolle dienten Hefestämme die das Leerplasmid oder das Hefe-Expressionsplasmid ohne A-Domäne (BHUM2157) tragen. Als Epithelzelllinie wurden Caco-2 Darmkrebszellen verwendet. Die Farbgebung wurde gemäß der strukturbasierten Verwandtschaft (Abbildung 13) gewählt.

Weiterhin ist zu beobachten, dass die A-Domänen von Epa9, Epa15 und Epa23 mit einem Wert von 20 – 22 % im Vergleich zum *S. cerevisiae* Stamm, der keine EpaA-Domäne auf seiner Oberfläche präsentiert, eine leicht erhöhte Adhäsion an Epithelzellen zeigen. Bei den restlichen EpaA-Domänen des *C. glabrata* Stammes CBS138 (Epa2A, Epa8A, Epa11A, Epa12A, Epa13A, Epa19A, Epa20A und Epa21A) adhärten 7 - 14 % der anfangs zugegeben *S. cerevisiae* Zellen an den Caco-2 Zellen, was vergleichbar mit der Adhäsion des *S. cerevisiae* Stammes ist, der nur das HA-Epitop und die Flo11BC-Domäne exprimiert.

2.6.3 Adhäsion der EpaA-Domänen an Polystyrol

Neben der Adhäsion an Epithelzellen ist *C. glabrata* in der Lage, Biofilme auf abiotischen Oberflächen zu bilden. Die Formation von Biofilmen auf medizinischen Instrumenten, wie beispielsweise Prothesen und Kathetern stellt ein großes Problem in Krankenhäusern dar, da es auf diesem Weg zu schwerwiegenden Infektionen von

Patienten mit *C. glabrata* kommt, die so von Patient zu Patient übertragen werden können oder den Befall innerer Organe ermöglichen. Aus diesem Grund sollte die Adhäsion der verschiedenen EpaA-Domänen an Polystyrol untersucht werden. Auch hierfür wurden *S. cerevisiae* Zellen verwendet, welche die verschiedenen EpaA-Domänen auf ihre Oberfläche präsentieren. Als Kontrolle dienten dieselben *S. cerevisiae* Stämme, wie bei der Untersuchung der Adhäsion an Caco-2 Zellen, sowie zwei weitere *S. cerevisiae* Stämme, wovon der eine nur die Flo11BC-Domäne exprimiert, und der andere anstelle der EpaA-Domänen die Flo11A-Domäne exprimiert. Die A-Domäne von Flo11 wurde gewählt, da bereits bekannt war, dass Flo11 Adhäsion an Polystyrol vermittelt. Die durch die verschiedenen EpaA-Domänen vermittelte Adhäsion wurde im Verhältnis zur der durch die Flo11A-Domäne vermittelten Adhäsion bestimmt (Abbildung 37).

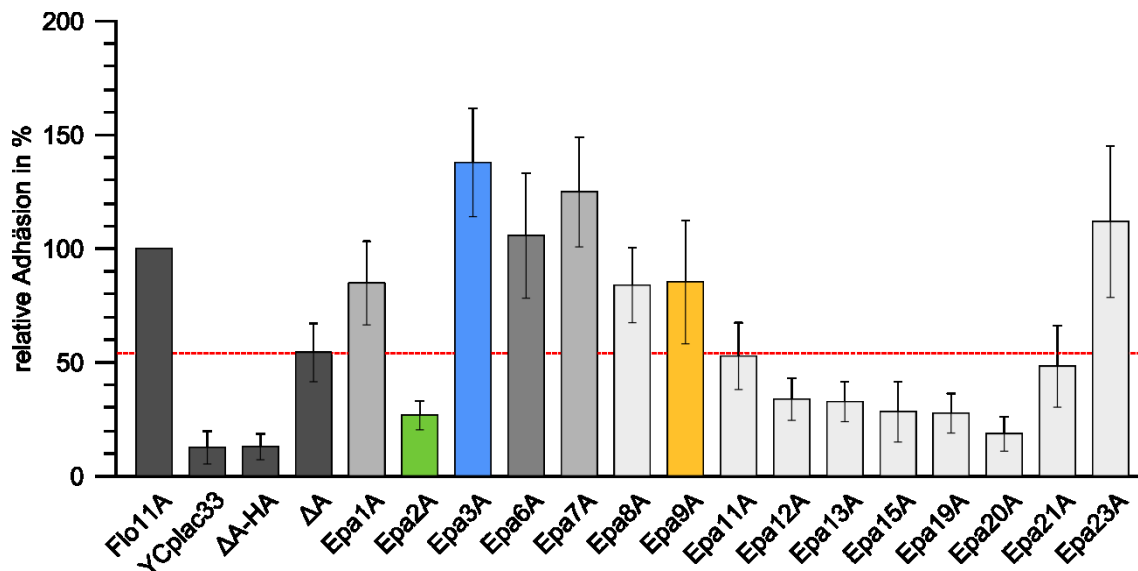


Abbildung 37: Relative Adhäsion der EpaA-Domänen an Polystyrol.

Die verschiedenen EpaA-Domänen sind mit der BC-Domäne von *FLO11* aus dem *S. cerevisiae* Stamm Σ1278b fusioniert und stehen unter Kontrolle des *PGK1*-Promotors. Als Plasmidrückgrat dient das *CEN*-Plasmid YCplac33 (B2445). Die hergestellten Konstrukte wurden in den *S. cerevisiae* Stamm YHUM0719 mit S288c-Stammhintergrund transformiert. Die erhaltenen Werte sind als Prozentangaben abgebildet. Die durch Flo11A (BHUM2158) vermittelte Adhäsion wurde dabei auf 100 % Bindung gesetzt. Als Negativkontrolle dienten die Hefestämme mit Leerplasmid, dem Hefe-Expressionsplasmid ohne A-Domäne (BHUM2157) sowie dem Hefe-Expressionsplasmid ohne A-Domäne und ohne 3HA-Tag (BHUM1964).

Wie erwartet vermittelt die A-Domäne von Flo11 eine starke Adhäsion an Polystyrol, die auf 100 % gesetzt wurde, alle anderen Werte wurden diesbezüglich normiert. Der *S. cerevisiae* Stamm, welcher weder das HA-Epitop noch die Flo11BC-Domäne exprimiert, zeigt hingegen eine sehr schwache Adhäsion von 10 %, die vergleichbar zu

der Adhäsion ist, die durch den *S. cerevisiae* Stamm vermittelt wird, der nur die Flo11BC-Domäne exprimiert (ΔA -HA). Der Hefestamm, der zwar keine A-Domäne exprimiert, jedoch die Flo11BC-Domänen und das 3HA-Epitop (ΔA), vermittelt wider Erwarten eine deutliche Adhäsion von 55 %, was darauf schließen lässt, dass das 3HA-Epitop zur Adhäsion an Polystyrol beiträgt. Die verschiedenen EpaA-Domänen wiesen unterschiedliches Bindungsverhalten an Polystyrol auf. Eine besonders starke Adhäsion (125-138 %) zeigen Hefestämme, welche die A-Domänen von Epa3 und Epa7 an ihrer Oberfläche präsentieren. Auch Adhäsion, die durch die A-Domänen von Epa6 und Epa23 vermittelt wird (105-112 %), ist stärker als die durch Flo11A vermittelte Adhäsion. Eine nicht ganz so hohe Adhäsion (85 %), wird durch die Epa1A, Epa8A und Epa9A präsentierenden Hefestämme vermittelt. Die A-Domänen von Epa11 und Epa21 vermitteln hingegen eine vergleichbare Adhäsion (48-53 %) wie der *S. cerevisiae* Stamm, der keine A-Domäne exprimiert (ΔA). Alle weiteren getesteten A-Domänen (Epa2A, Epa12A, Epa13A, Epa15A, Epa19A und Epa20A) vermitteln nur schwache Adhäsion (18-34 %) an Polystyrol.

Zusammenfassend adhären die verschiedenen EpaA-Domänen unterschiedlich an Polystyrol. Zudem korreliert die Adhäsion an Polystyrol nicht mit der Adhäsion an Epithelzellen. Des Weiteren stellt sich die Frage, warum einige Stämme, welche Epa11A bis Epa21A auf ihrer Oberfläche präsentieren eine geringere relative Adhäsion als die Negativkontrolle (ΔA) vermittelten. Vermutlich inhibieren hierbei die EpaA-Domänen die Adhäsion des HA-Epitops an Polystyrol. Um den Einfluss der EpaA-Domäne auf die Adhäsion an Polystyrol besser zu testen, sollte in Zukunft ein anderes Epitop zum Nachweis der EpaA-Domänen auf der Hefeoberfläche gewählt werden.

2.6.4 Adhäsives Wachstum der EpaA-Domänen auf Agar

Um das Adhäsionsverhalten der verschiedenen EpaA-Domänen auf anderen Glykanhaltigen Oberflächen zu untersuchen, wurde ein Adhäsionstest auf Agar durchgeführt. Das Geliermittel Agar wird aus den Zellwänden einiger Algen, hauptsächlich Rotalgen gewonnen und besteht zu 90 % aus Galactose-Polymeren mit den Grundbausteinen Agarose und Agaropektin. Um die Adhäsion an Agar zu überprüfen wurden ebenfalls die *S. cerevisiae* Stämme verwendet, die die verschiedenen EpaA-Domänen an ihre Oberfläche präsentieren. Diese wurden auf YPD-Festmedium

ausgestrichen und anschließend für 5 Tage bei 30 °C inkubiert. Als Kontrollen dienten erneut die Hefestämme, die bei der Untersuchung der Adhäsion an Polystyrol verwendet wurden. Um das Gesamtwachstum festzuhalten, wurden die Platten vor dem Waschen fotografiert. Nach einem ersten, sanften Waschschrift der Agar-Platten wurde ebenfalls ein Foto gemacht, um zu dokumentieren welche Hefezellen nicht adhärten und schon durch leichtes Waschen abgeschwemmt wurden. Zuletzt wurden die Platten mit hohem Druck durch einen Wasserstrahl gewaschen, um zu untersuchen welche EpaA-Domänen eine starke Bindung an Agar vermitteln. Auch nach diesem Schritt wurde ein Foto gemacht, um das adhäsive Wachstum auf Agar festzuhalten (Abbildung 38).

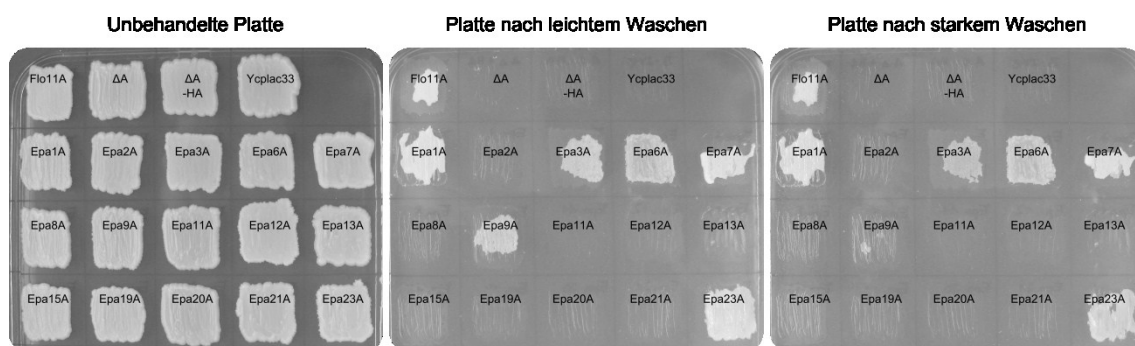


Abbildung 38: Waschtest zur Analyse der Bindung von EpaA-Domänen an Agar.

Die verschiedenen EpaA-Domänen sind mit der BC-Domäne von *FLO11* aus dem *S. cerevisiae* Stamm $\Sigma 1278b$ fusioniert und stehen unter Kontrolle des *PGK1*-Promotors. Als Plasmidrückgrat dient das *CEN*-Plasmid YCplac33 (B2445). Die hergestellten Konstrukte wurden in den *S. cerevisiae* Stamm YHUM0719 mit S288c-Stammhintergrund transformiert. Als Negativkontrolle dienten die Hefestämme mit Leerplasmid, dem Hefe-Expressionsplasmid ohne A-Domäne (BHUM2157) sowie dem Hefe-Expressionsplasmid ohne A-Domäne und ohne 3HA-Tag (BHUM1964). Als Positivkontrolle dient die A-Domäne von Flo11 (BHUM2158). Die verschiedenen Hefestämme wurden auf YPD-Agar-Platten ausgestrichen und für 5 Tage bei 30 °C inkubiert. Zur Dokumentation des Adhäsionsverhaltens wurden die Platten im unbehandelten Zustand (links), nach leichtem Waschen (Mitte) und nach starkem Waschen (rechts) fotografiert.

Alle Hefestämme, die keine A-Domänen exprimieren (YCplac33, ΔA -HA, ΔA), wurden bereits durch das erste, leichte Waschen von der Platte geschwemmt. Der *S. cerevisiae* Stamm, der anstelle der EpaA-Domänen die A-Domäne von Flo11 exprimiert, haftete trotz starken Waschens immer noch am Agar. Ansonsten vermitteln die verschiedenen EpaA-Domänen unterschiedlich starke Bindungen an Agar. Hefestämme, welche die A-Domänen von Epa2, Epa8, Epa11, Epa12, Epa13, Epa15, Epa19, Epa20 und Epa21 auf ihrer Oberfläche präsentieren, ließen sich alle bereits durch leichtes Waschen von der Agar-Platte lösen. Epa1A, Epa3A, Epa6A, Epa7A und Epa23A vermitteln hingegen eine starke Adhäsion an Agar, die vergleichbar zu der durch Flo11A vermittelten

Adhäsion ist. Die A-Domäne von Epa9 vermittelt eine leichte Adhäsion, sodass nach leichtem Waschen noch einige Zellen auf dem Agar verblieben, die durch den starken Waschriff aber entfernt wurden.

Zusammenfassend vermitteln die A-Domänen von Epa1, Epa6 und Epa7, wie auch im Adhäsionstest an Caco-2 Zellen, eine starke Bindung an Agar. Epa9A und Epa23A zeigten sowohl im Adhäsionstest an Caco-2 Zellen, als auch an Agar eine leichte Adhäsion. Epa3A präsentierende Hefezellen wiesen lediglich eine hohe Adhäsion an Polystyrol auf. Es ist anzumerken, dass für alle EpaA-Domänen, die an Agar hafteten, mindestens ein K_D -Wert $< 10 \mu\text{M}$ an das T-Antigen gemessen wurde (Abbildung 30). Für Epa12A wurde hingegen eine Ligandenbindungskonstante von $33,8 \mu\text{M}$ gemessen, die voraussichtlich zu gering ist um Adhäsion an Agar zu vermitteln. Epa9A zeigt eine schwächere Adhäsion an Agar, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die vermittelte Bindungskonstante zum T-Antigen zwischen $10 \mu\text{M}$ und dem K_D -Wert von Epa12A liegt.

2.7 Funktionelle Analyse konservierter Strukturelemente *in vivo* mit *S. cerevisiae* als Modellorganismus

2.7.1 Identifizierung und Mutation konservierter Strukturelemente

Aufgrund der Strukturlösung der A-Domäne von Epa1 waren Informationen bekannt, die in dieser Arbeit mittels strukturbasierter Sequenzanalyse auf die weiteren EpaA-Domänen übertragen wurden (Abbildung 12). Dadurch konnten Struktur motive identifiziert werden, die voraussichtlich einen entscheidenden Beitrag zur Funktionalität der Epa-Familie leisten. Hierbei ist insbesondere das DcisD-Motiv, der Tryptophanrest in L3, sowie die Disulfidbrücke zwischen L1 und L2 zu nennen. Um den Einfluss dieser Struktur motive auf die Affinität und auch auf die Spezifität zu testen, wurden einzelne Aminosäuren innerhalb der Epa1A-Domäne ausgetauscht, um anschließend das Adhäsionsverhalten mittels *in vivo* System zu untersuchen. Dabei sollte getestet werden, ob die Komplexierung des Calciumions durch Unterbrechung des DcisD-Motivs verhindert wird, was zu einem Verlust der, durch die Epa1A-Domänen vermittelten, Ligandenbindung führen würde. Des Weiteren sollte noch der Einfluss der aromatischen Bestandteile des Tryptophanrest W198 aus L3 betrachtet werden, weshalb dieser nicht nur in ein Alanin sondern auch für ein Histidin und für ein Tyrosin ausgetauscht wurde.

Damit ließe sich abschätzen ob und wie stark welcher der beiden aromatischen Bestandteile des Tryptophan W198 die Ligandenbindung vermittelt. Zuletzt sollte noch überprüft werden, inwieweit sich die Bindungsaffinität ändert, wenn die beiden Schleifen L1 und L2 nicht mehr über eine Disulfidbrücke miteinander verknüpft sind. Dazu wurde das Cystein an Position 78 gegen ein Serin ausgetauscht, welches vergleichbare polare Eigenschaften aufweist, jedoch nicht mehr zur Bildung von Disulfidbrücken befähigt ist (Tabelle 6).

Tabelle 6: Mutationen innerhalb der Epa1A-Domäne.

Konstruktname	unveränderte A-Domäne	Mutation	Caco-2 in %	Polystyrol in %	Agar
Epa1	Epa1A	keine	59	85	+++
Epa1A ^{D165A}	Epa1A	D165 zu A165	5	71	---
Epa1A ^{W198A}	Epa1A	W198 zu A198	22	48	---
Epa1A ^{W198H}	Epa1A	W198 zu H198	53	56	+++
Epa1A ^{W198Y}	Epa1A	W198 zu Y198	67	56	+++
Epa1A ^{C78S}	Epa1A	C78 zu S78	12	57	---

Nach Herstellung der *S. cerevisiae* Stämme, welche die verschiedenen, mutierten Epa1A-Domänen auf ihrer Oberfläche präsentierten, konnte nachfolgend die Adhäsion an Epithelzellen, Polystyrol und Agar, wie in Abschnitt 2.6 beschrieben, getestet werden (Abbildung 39).

2.7.2 Einfluss des DcisD-Motivs an der Bindungsvermittlung

Lediglich 6 % der Hefezellen, welche die Epa1A^{D165A}-Domäne auf ihrer Oberfläche präsentieren, adhären an den Epithelzellen, und es kann kein adhäsives Wachstum auf Agar beobachtet werden. Die durch die Epa1A^{D165A}-Domäne vermittelte, relative Adhäsion ist vergleichbar mit der der Kontrollstämme, welche keine EpaA-Domäne auf ihrer Oberfläche präsentieren. Dies erklärt sich dadurch, dass die Funktion des DcisD-Motivs bei der Epa1A^{D165A}-Domäne zerstört wurde, indem die Asparaginsäure an Position 165 zu einem Alanin mutiert wurde. Dadurch ist die Komplexierung eines Calciumions, welches zur Glykanbindung benötigt wird, nicht mehr gewährleistet, was zu einem Verlust der Adhäsionsfähigkeit an terminale Galactoside führt, welche an der Oberfläche von Caco-2 Epithelzellen und Agar lokalisiert sind.

2.7.3 Einfluss des Tryptophanrestes W198 an der Bindungsvermittlung

Hefestämme, die die A-Domänen Epa1A^{W198Y} und Epa1A^{W198H} auf ihrer Oberfläche präsentieren, vermitteln eine vergleichbare Adhäsion an Caco-2 Zellen wie die unveränderte Epa1A-Domäne. Die Epa1A^{W198A}-Domäne vermittelt hingegen eine deutlich verringerte relative Adhäsion, sodass nur 22 % der anfangs zugegebenen Hefezellen an den Epithelzellen adhärieren.

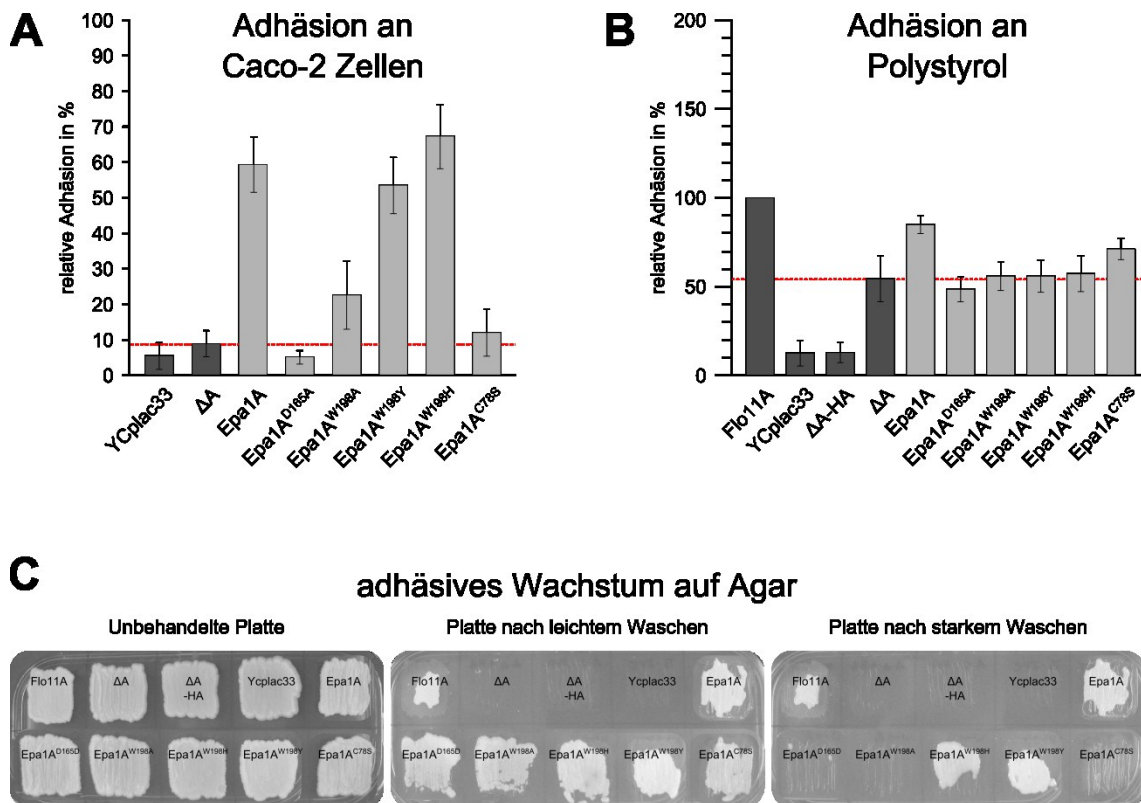


Abbildung 39: Adhäsionstests mit *S. cerevisiae* Stämmen, die verschiedene, mutierte Epa1A-Domänen auf ihrer Oberfläche präsentierten, an Caco-2 Zellen, Polystyrol und Agar.

Die verschiedenen, mutierten Epa1A-Domänen sind mit der BC-Domäne von *FLO11* aus dem *S. cerevisiae* Stamm Σ1278b fusioniert und stehen unter Kontrolle des *PGK1*-Promotors. Als Plasmidrückgrat dient das *CEN*-Plasmid YCplac33 (B2445). Die hergestellten Konstrukte wurden in den *S. cerevisiae* Stamm YHUM0719 mit S288c-Stammhintergrund transformiert. Als Kontrolle dienten die Hefestämme, die das *CEN*-Plasmid (YCplac33), das Hefe-Expressionsplasmid ohne A-Domäne (BHUM2157) oder das Hefe-Expressionsplasmid ohne A-Domäne und ohne 3HA-Tag (BHUM1964) tragen. A) Relative Adhäsion an Caco-2 Epithelzellen nach 2 Stunden: Die erhaltenen Werte stellen die adhärierenden Zellen im Verhältnis zur Gesamtmenge an Hefezellen nach 2 Stunden dar. Als Epithelzelllinie dienten Caco-2 Darmkrebszellen. B) Relative Adhäsion an Polystyrol: Die erhaltenen Werte sind als Prozentangaben abgebildet. Die durch Flo11A vermittelte Adhäsion wurde dabei auf 100 % Bindung gesetzt. C) Waschtest zur Analyse des adhäsiven Wachstums auf Agar: Die untersuchten Hefestämme wurden auf einer YPD-Agar-Platte ausgestrichen und für 5 Tage bei 30 °C inkubiert. Zur Dokumentation des Adhäsionsverhaltens wurden die Platten im unbehandelten Zustand (links), nach leichtem Waschen (mitte) und nach starkem Waschen (rechts) fotografiert.

Ein vergleichbares Bild zeigt sich bei der Untersuchung des adhäsiven Wachstums auf Agar. Der Austausch des Tryptophan W198 der L3 Schleife zu einem Alanin

(Epa1A^{W198A}) führt zu einer deutlichen Verringerung der Adhäsion an Caco-2 Zellen und Agar. Durch den Verlust der aromatischen Aminosäure an dieser Position, können terminale Galactoside nicht mehr über hydrophobe Wechselwirkungen innerhalb der Ligandenbindungstasche stabilisiert werden. Durch den Austausch des Tryptophans zu einer Aminosäure mit aromatischem Imidazolring (Epa1A^{W198H}) oder zu einer Aminosäure, die einen Aromaten aus sechs Kohlenstoffen trägt (Epa1A^{W198Y}), lässt sich der Einfluss der beiden aromatischen Komponenten des Tryptophans an der Bindungsvermittlung untersuchen. Beide A-Domänen vermitteln eine vergleichbare Adhäsion wie die unveränderte Epa1A-Domäne. Inwieweit sich die vermittelte Bindungsstärke der Epa1A-Domäne von Epa1A^{W198H} oder Epa1A^{W198Y} unterscheidet, müsste durch zukünftige Ermittlung der Ligandenbindungskonstanten quantifiziert werden.

2.7.4 Einfluss der Disulfidbrücke zwischen L1 und L2 an der Bindungsvermittlung

Die durch Epa1A^{C78S} vermittelte relative Adhäsion der Hefezellen an Caco-2 Zellen beträgt 12 % und ist nur geringfügig höher als die der Kontrollstämme ohne EpaA-Domäne. Zudem kann kein adhäsives Wachstum auf Agar beobachtet werden. Bei Epa1A^{C78S} kann keine Disulfidbrücke zwischen L1 und L2 ausgebildet werden, da das Cystein an Position 78 durch ein Serin ersetzt wurde. Sowohl die Adhäsion an Epithelzellen, als auch das adhäsive Wachstum auf Agar war deutlich verringert und vergleichbar zur Adhäsion von Hefestämmen, die keine EpaA-Domäne auf ihre Oberfläche präsentieren. Auch dies war zu erwarten, da die Bindungstasche ohne Verknüpfung von L1 mit L2, voraussichtlich weniger dicht gepackt ist, was zu einer verringerten Koordination des Liganden führt und zudem dessen Bindung schlechter vor Lösungsmiteleinflüssen abschirmt.

Zusammenfassend korreliert die Adhäsion an Agar gut mit der Adhäsion an Epithelzellen. Die vergleichbaren Ergebnisse der Adhäsionstests an Agar und Epithelzellen lassen sich darauf zurückführen, dass in beiden Fällen die Adhäsion an Galactoside untersucht wurde. Bei der Untersuchung der relativen Adhäsion an Polystyrol zeigte sich hingegen, dass sich die erhaltenen Werte der untersuchten *S. cerevisiae* Stämme kaum voneinander unterscheiden. Demnach lässt sich die Bindung an Polystyrol voraussichtlich nicht auf die untersuchten konservierten

Strukturelemente zurückführen, da ihre Mutation keinen Phänotyp herbeiführt und alle mutierten Epa1A-Domänen eine vergleichbare Adhäsion vermitteln.

2.8 Funktionelle *in vivo* Analyse variabler Bereiche

2.8.1 Identifizierung und Mutation variabler Bereiche

Durch die strukturbasierte Klassifizierung zeigten sich vier Untergruppen (Epa1-Untergruppe, Epa2-Untergruppe, Epa3-Untergruppe und Epa9-Untergruppe) in der Epa-Familie, innerhalb derer die CBL2-Region konserviert ist (Abbildung 13). Da diese Region in der Bindungstasche lokalisiert ist, wird vorausgesagt dass sie maßgeblich an der Spezifitätsvermittlung des sekundären Glykanrests beteiligt ist (Maestre-Reyna, *et al.*, 2012). Um den Einfluss der CBL2-Region auf die Substratspezifität zu untersuchen, wurden mittels sequenzspezifischer Mutagenese Varianten der EpaA-Domänen erstellt, bei denen die CBL2-Region durch die CBL2-Region einer anderen Epa-Untergruppe ersetzt wurde (CBL2-Austauschvarianten). Anschließend wurde ihr Adhäsionsverhalten mittels *in vivo* System untersucht (Tabelle 7, Abbildung 40).

Tabelle 7: CBL2-Austauschvarianten der EpaA-Domänen.

Konstrukt-name	A-Domäne	CBL2-Region	Austausch	Caco-2 in %	Polystyrol in %	Agar
Epa1	Epa1	Epa1	kein Austausch	59	85	+++
Epa1 ^{CBL2Epa2}	Epa1	Epa2	REYD zu RDNN	36	71	+++
Epa1 ^{CBL2Epa3}	Epa1	Epa3	REYD zu IGKD	6	78	---
Epa1 ^{CBL2Epa6}	Epa1	Epa6	REYD zu RDND	44	87	+++
Epa1 ^{CBL2Epa9}	Epa1	Epa9	REYD zu RDYH	50	83	+++
Epa2	Epa2	Epa2	kein Austausch	10	27	---
Epa2 ^{CBL2Epa1}	Epa2	Epa1	RDNN zu REYD	6	22	---
Epa2 ^{CBL2Epa3}	Epa2	Epa3	RDNN zu IGKD	5	21	---
Epa3	Epa3	Epa3	kein Austausch	9	138	++
Epa3 ^{CBL2Epa1}	Epa3	Epa1	IGKD zu REYD	8	160	++
Epa3 ^{CBL2Epa2}	Epa3	Epa6	IGKD zu RDNN	9	156	++
Epa6	Epa6	Epa6	kein Austausch	49	106	++
Epa6 ^{CBL2Epa1}	Epa6	Epa1	RDND zu REYD	28	104	---
Epa9	Epa9	Epa9	kein Austausch	19	85	++
Epa9 ^{CBL2Epa1}	Epa9	Epa1	RDYH zu REYD	10	94	+

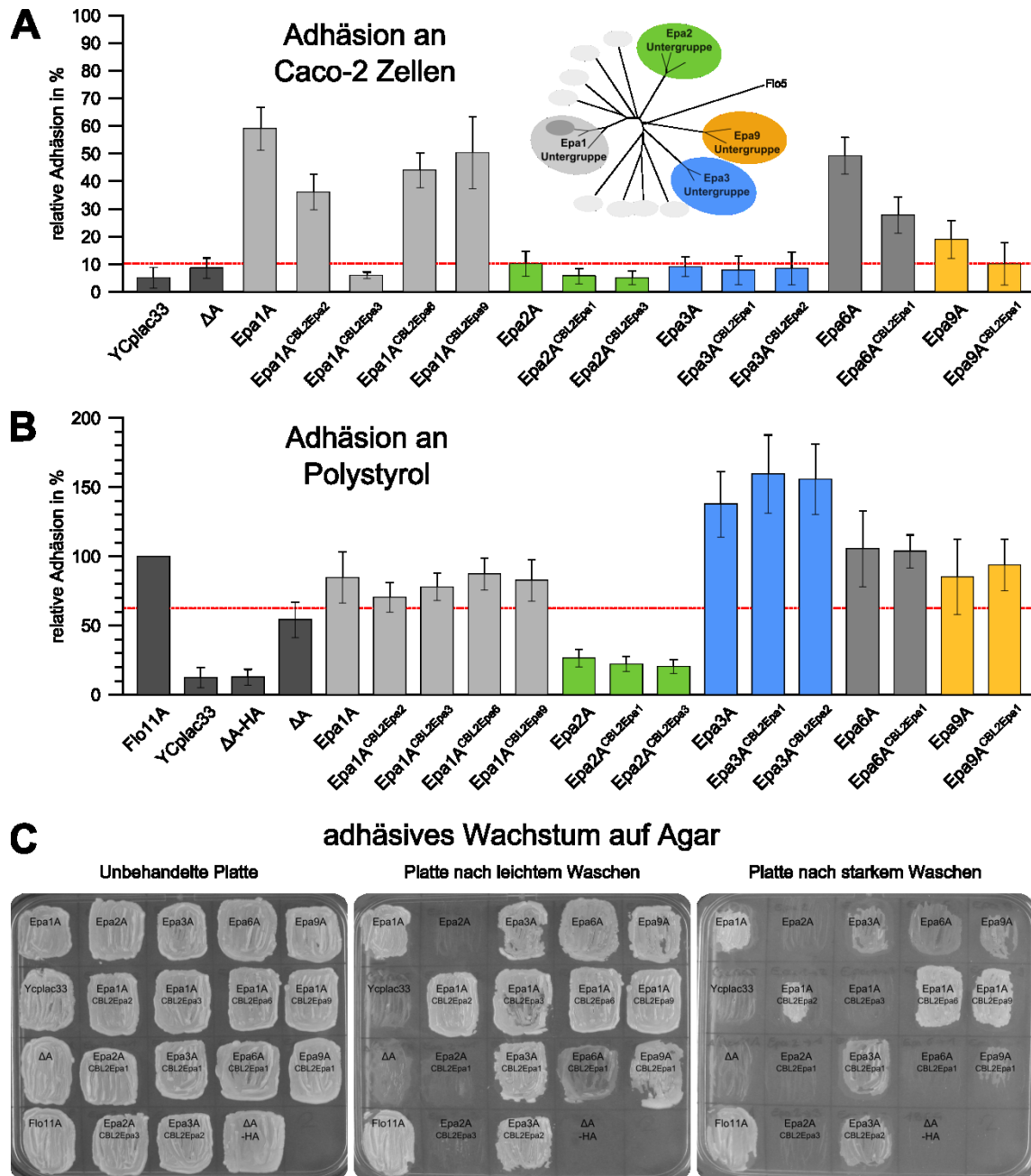


Abbildung 40: Adhäsionstests mit *S. cerevisiae* Stämmen, die verschiedene EpaA CBL2-Austauschvarianten auf ihrer Oberfläche präsentierten, an Caco-2 Zellen, Polystyrol und Agar.

Die verschiedenen EpaA-Domänen mit ausgetauschter CBL2-Region sind mit der BC-Domäne von *FLO11* des *S. cerevisiae* Stamm $\Sigma 1278b$ fusioniert und stehen unter Kontrolle des *PGK1*-Promotors. Als Plasmidrückgrat dient das *CEN*-Plasmid YCplac33 (B2445). Die hergestellten Konstrukte wurden in den *S. cerevisiae* Stamm YHUM0719 mit S288c-Stammhintergrund transformiert. Als Kontrolle dienten die Hefestämme, die das *CEN*-Plasmid (YCplac33), das Hefe-Expressionsplasmid ohne A-Domäne (BHUM2157) oder das Hefe-Expressionsplasmid ohne A-Domäne und ohne 3HA-Tag (BHUM1964) tragen. A) Relative Adhäsion an Caco-2 Epithelzellen: Die erhaltenen Werte stellen die adhärierenden Zellen nach 2 Stunden im Verhältnis zur Gesamtmenge an Hefezellen dar. Als Epithellinien dienten Caco-2 Darmkrebszellen. B) Relative Adhäsion an Polystyrol: Die erhaltenen Werte sind als Prozentangaben abgebildet. Die durch Flo11A vermittelte Adhäsion wurde dabei auf 100 % Bindung gesetzt. C) Waschtest zur Analyse des adhäsiven Wachstums auf Agar: Die untersuchten Hefestämme wurden auf einer YPD-Agar-Platte ausgestrichen und für 5 Tage bei 30 °C inkubiert. Zur Dokumentation des Adhäsionsverhaltens wurden die Platten im unbehandelten Zustand (links), nach leichtem Waschen (mitte) und nach starkem Waschen (rechts) fotografiert.

2.8.2 Einfluss der CBL2-Region auf die Adhäsion an Caco-2 Zellen und Agar

2.8.2.1 Austausch der CBL2-Region der A-Domäne von Epa1A durch die CBL2-Region der anderen Epa-Untergruppen

Der Austausch der CBL2-Region innerhalb der Epa1A-Domänen führt im Falle von Epa1A^{CBL2Epa2} zu einer leicht verminderten Adhäsion an Caco-2 Zellen und Agar, jedoch reicht der alleinige Austausch der CBL2-Region durch die von Epa2A nicht aus und die Bindung zu unterdrücken. Epa1A^{CBL2Epa3} und Epa3A vermitteln beide keine Adhäsion der Hefezellen an Epithelzellen. Demnach scheint der Austausch der CBL2-Region hinreichend für einen Funktionswechsel zu sein.

Bei Betrachtung der Adhäsion an Agar fällt jedoch auf, dass sowohl Epa1A als auch Epa3A adhäsives Wachstum an Agar vermitteln, was für Epa1A^{CBL2Epa3} nicht der Fall ist. Somit führt der Austausch der CBL2-Region zwar zu einer Änderung der Funktion, jedoch nicht zu einem Funktionswechsel. Epa1A^{CBL2Epa6} und Epa1A^{CBL2Epa9} vermitteln beide eine starke Adhäsion an Caco-2 Zellen und Agar. Dies war zu erwarten, da sowohl Epa1A, Epa6A und Epa9A Adhäsion an Epithelzellen und Agar vermitteln. Um zu überprüfen ob ein Wechsel der Funktion stattgefunden hat, müssten jedoch Bindungsspezifitätsprofile mittels *Glykan Array Screening* bestimmt werden.

2.8.2.2 Austausch der CBL2-Region der A-Domäne von Epa2

S. cerevisiae Stämme, die Epa2A auf ihrer Oberfläche präsentieren vermitteln keine Adhäsion an Epithelzellen und Agar. Durch Austausch der CBL2-Region von Epa1A wäre zu erwarten, dass Epa2A^{CBL2Epa1} Bindung der Hefezellen ans Caco-2 Zellen oder Agar vermittelt. Dies konnte jedoch nicht beobachtet werden, sodass der Austausch der CBL2-Region nicht ausreichend für einen Funktionswechsel ist. Epa2A, Epa3A und Epa2A^{CBL2Epa3} vermitteln alle keine Adhäsion der Hefezellen an Caco-2, sodass keine Aussage über einen möglichen Funktionswechsel getroffen werden kann. Epa3A vermittelt jedoch adhäsives Wachstum auf Agar, was nicht für *S. cerevisiae* Stämme beobachtet werden konnte, die Epa2A oder Epa2A^{CBL2Epa3} auf ihre Oberfläche präsentieren. Demnach ist im Fall von Epa2A^{CBL2Epa3} der Austausch der CBL2-Region nicht hinreichend um einen Funktionswechsel hervorzurufen.

2.8.2.3 Austausch der CBL2-Region der A-Domäne von Epa3A

Epa1A, Epa3A und Epa3A^{CBL2Epa1} vermitteln alle adhäsives Wachstum auf Agar. Demnach kann nicht festgestellt werden, ob der CBL2-Austausch hinreichend für einen Funktionswechsel ist. An Epithelzellen hingegen können Hefestämme, die Epa1A auf ihre Oberfläche präsentieren stark adhären, wohingegen Epa3A und Epa3A^{CBL2Epa1} keine Adhäsion an Caco-2 Zellen vermittelt. Demnach ist der Austausch der CBL2-Region im Fall von Epa3A^{CBL2Epa1} nicht hinreichend für einen Funktionswechsel. Da anhand CFG-Analysen gezeigt werden konnte, dass Epa1A und Epa3A sehr ähnliche Ligandenbindungsspezifitäten vermitteln, wäre die Ermittlung eines Bindungsspezifitätsprofils von Epa3A^{CBL2Epa1} mittels *Glykan Array Screening* von hohem Interesse, um zu verstehen, warum Epa3A^{CBL2Epa1} nicht zur Adhäsion an Caco-2 Zellen befähigt ist (Abbildung 20, Abbildung 21). Epa3A^{CBL2Epa2} vermittelt keine Adhäsion an Epithelzellen, was zu erwarten war, da weder Epa3A noch Epa2A Adhäsion an Epithelzellen vermitteln. Auf Agar hingegen kann adhäsives Wachstum der Hefestämme beobachtet werden, die Epa3A und Epa3A^{CBL2Epa2} auf ihre Oberfläche präsentieren. Demnach scheint kein Funktionswechsel stattgefunden zu haben. Die Ermittlung eines Bindungsspezifitätsprofils von Epa3A^{CBL2Epa2} wäre ebenfalls sehr interessant und könnte durch den Vergleich mit den erhaltenen Bindungsspezifitätsprofilen von Epa3A und Epa3A^{CBL2Epa1} Aufschluss über den Einfluss des CBL2-Austausches und die durch Epa2A vermittelte Bindungsspezifität geben.

2.8.2.4 Austausch der CBL2-Region der A-Domäne von Epa6

Epa6A und Epa1A vermitteln beide starke Adhäsion an Caco-2 Zellen, weshalb zu erwarten war, dass der *S. cerevisiae* Stamm, der Epa6A^{CBL2Epa1} auf seiner Oberfläche präsentiert, ebenfalls an Caco-2 Zellen adhärert. Jedoch ist die von Epa6A^{CBL2Epa1} vermittelte Adhäsion an Caco-2 Zellen deutlich geringer. Bei Betrachtung des adhäsiven Wachstums auf Agar zeigt sich ein ähnliches Bild. Epa1A und Epa6A vermitteln starke Adhäsion, wohingegen für Epa6A^{CBL2Epa1} kein adhäsives Wachstum beobachtet werden konnte. Demnach kann von einer Funktionsänderung, jedoch keinem Funktionswechsel durch Austausch der CBL2-Region ausgegangen werden.

2.8.2.5 Austausch der CBL2-Region der A-Domäne von Epa9

Epa9A vermittelt zwar Adhäsion an Caco-2 Zellen, jedoch ist diese deutlich geringer als die durch Epa1A vermittelte. Dies lässt sich auch anhand des adhäsiven Wachstums auf Agar beobachten. Für den Epa9A^{CBL2Epa1} präsentierenden *S. cerevisiae* Stamm konnte keine Adhäsion an Caco-2 Zellen und nur schwaches adhäsives Wachstum auf Agar beobachtet werden. Demnach führt der Austausch der CBL2-Region im Fall von Epa9A^{CBL2Epa1} zu einer Funktionsänderung. Wie bereits beschrieben, vermittelt Epa1A^{CBL2Epa9} hingegen starke Adhäsion an Epithelzellen und starkes adhäsives Wachstum auf Agar. Dass der CBL2-Austausch von Epa1A durch die CBL2-Region von Epa9A und umgekehrt zu zwei Varianten mit völlig unterschiedlicher Funktion führt, macht die Ermittlung der Bindungsspezifitätsprofile von Epa1A^{CBL2Epa9} und Epa9A^{CBL2Epa1} mittels *Glykan Array Screening* sehr interessant.

Zusammenfassend zeigt sich, dass der Austausch der CBL2-Region bei keiner der EpaA CBL2-Austauschvarianten zu einem Funktionswechsel geführt hat. Dafür konnte in mehreren Fällen eine Änderung der Bindungsvermittlung beobachtet werden. Um den Einfluss der CBL2-Region auf die Bindungsspezifität besser zu beurteilen, wäre es von hohem Interesse, Bindungsspezifitätsprofile einzelner EpaA-Varianten mit ausgetauschter CBL2-Region mittels CFG-Analysen zu ermitteln.

2.8.3 Einfluss der CBL2-Region auf die Adhäsion an Polystyrol

Für alle EpaA CBL2-Austauschvarianten konnte keine starke Änderung der Adhäsion im Vergleich zur zugehörigen, unveränderten EpaA-Domäne ermittelt werden (Abbildung 40). Dies spricht dafür, dass die CBL2-Region nicht an der Bindungsvermittlung an Polystyrol beteiligt ist. Ähnliche Beobachtungen konnten bereits anhand der Untersuchung konservierter Strukturelemente gemacht werden (Abschnitt 2.7). Zudem korreliert die Adhäsion der EpaA-Varianten an Polystyrol nicht mit der beobachteten Änderung der relativen Adhäsion an Epithelzellen und des adhäsiven Wachstums auf Agar (Abbildung 40). Demnach ist die Bindung an Polystyrol nicht auf die Ligandenbindungstasche sondern auf andere Bereiche der EpaA-Domänen zurückzuführen.

2.9 Biochemische Charakterisierung variabler Bereiche

2.9.1 Ermittlung der Bindungsspezifitätsprofile von EpaA-Domänen mit ausgetauschter CBL2-Region mittels *Glycan Array Screening*

Im Rahmen dieser Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass der Austausch der CBL2-Region die Funktion der EpaA-Domänen teilweise beeinflusst. Für eine genauere Beurteilung der erhaltenen Ergebnisse, und um den Einfluss auf die Bindungsspezifität besser beurteilen zu können, sollten nachfolgend die CFG-Profile einzelner EpaA-Domänen mit ausgetauschter CBL2-Region ermittelt und untersucht werden. Der Austausch der CBL2-Region von Epa1 durch die CBL2-Region von Epa6 und der Epa2- und Epa3-Untergruppe wurde bereits früher durchgeführt und biochemisch sowie kristallographisch untersucht, wobei eine Spezifitätsänderung beobachtet werden konnte (Maestre-Reyna, *et al.*, 2012). Um diese Untersuchungen zu ergänzen sollte zunächst ein Bindungsspezifitätsprofil der CBL2-Austauschvariante Epa1A^{CBL2Epa9} ermittelt werden. Epa9A^{CBL2Epa1} vermittelte keine Adhäsion an Epithelzellen und nur schwaches adhäsives Wachstum an Agar, sodass sich die Frage stellte, warum im Fall von Epa1A^{CBL2Epa9} die Funktion erhalten bleibt, für Epa9A^{CBL2Epa1} aber nicht. Aus diesem Grund sollte auch für Epa1A^{CBL2Epa9} ein Bindungsspezifitätsprofil ermittelt werden. Für Epa1A und Epa3A konnte gezeigt werden, dass sie die gleiche Ligandenspezifität vermitteln (Abbildung 20, Abbildung 21). Epa1A^{CBL2Epa3}, Epa3A, Epa3A^{CBL2Epa1} und Epa3A^{CBL2Epa2} zeigten im Gegensatz zu Epa1A keine Adhäsion an Caco-2 Zellen (Abbildung 40). Auf Agar hingegen konnte für Epa3A, Epa3A^{CBL2Epa1} und Epa3A^{CBL2Epa2} adhäsives Wachstum beobachtet werden (Abbildung 40). Der Austausch der CBL2-Region von Epa3A scheint demnach einen erheblichen Einfluss auf dessen Funktionalität zu haben, weshalb ebenfalls Bindungsspezifitätsprofile von Epa3A^{CBL2Epa1} und Epa3A^{CBL2Epa2} erstellt wurden.

Es wurden die vier CBL2-Austauschvarianten Epa9A^{CBL2Epa1}, Epa9A^{CBL2Epa1}, Epa3A^{CBL2Epa1} und Epa3A^{CBL2Epa2} zunächst wie in Abschnitt 2.2.1 heterolog mittels *E. coli* hergestellt und aufgereinigt (Abbildung 14). Anschließend wurden Bindungsspezifitätsprofile mittels *Glycan array screening*, wie in Abschnitt 2.3.1 beschrieben ermittelt (Abbildung 69). Für das Bindungsspezifitätsprofil von Epa1A^{CBL2Epa9} konnten die höchsten maximalen Fluoreszenzintensitäten und ein hohes Signal-Rausch-Verhältnis gemessen werden, sodass die erhaltenen Ergebnisse eine

deutliche Spezifitätsvermittlung durch Epa1A^{CBL2Epa9} zeigen. Für die Bindungsspezifitätsprofile von Epa9A^{CBL2Epa1} und Epa3A^{CBL2Epa1} konnten keine hohen Fluoreszenzintensitäten gemessen werden, trotzdem befinden sich schwache Signalpeaks an den Positionen 100 bis 130. Im diesem Bereich sind terminale Galactoside auf dem Glykan-Chip lokalisiert (Abschnitt 6.5). Für das Bindungsspezifitätsprofil von Epa3A^{CBL2Epa2} konnten weder eine hohe relative Fluoreszenz noch herausstechende Signalpeaks beobachtet werden, weshalb Epa3A^{CBL2Epa2} voraussichtlich insgesamt keine starke Bindung an Glykane vermittelt.

2.9.2 Klassifizierung anhand terminaler Glykanstrukturen

Auch für die EpaA CBL2-Austauschvarianten sollte, wie in Abschnitt 2.3.3 beschrieben, die Bindungsspezifität zu terminalen Galactosiden analysiert werden. Für einen besseren Vergleich sind die erhaltenen Ligandenbindungsprofile der EpaA CBL2-Austauschvarianten zusammen mit den Ergebnissen der unveränderten EpaA-Domänen abgebildet (Abbildung 41).

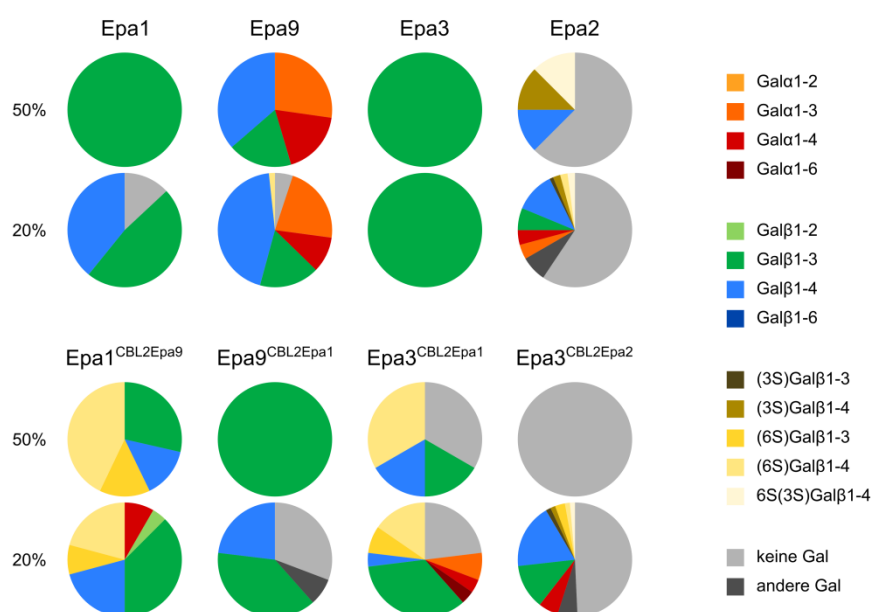


Abbildung 41: Ligandenbindungsprofile von EpaA CBL2-Austauschvarianten unter Berücksichtigung terminaler Galactoside.

Die Tortendiagramme repräsentieren die Bindung der EpaA CBL2-Austauschvarianten an verschiedene terminale Galactosid-Klassen, die eine relative Fluoreszenzintensität von $\geq 20\%$ oder $\geq 50\%$ der Fluoreszenzintensität des bestgebundenen Liganden aufweisen (Tabelle 47 und Tabelle 48). Es wurden ausschließlich verzweigte Glykan-Liganden berücksichtigt, die eindeutig einer Gruppe von terminalen Galactosiden und der darauffolgenden Verknüpfung zugeordnet werden konnten. Der Farbcodierung für die unterschiedlichen Galactosid-Typen ist neben den Tortendiagrammen abgebildet.

Die Ergebnisse zeigen, dass Epa1A^{CBL2Epa9} im Gegensatz zu den A-Domänen von Epa1 und Epa9, bevorzugt Bindung zu terminalen sulfatierten Galactosiden vermittelt. Bei Betrachtung der 50 % Grenze zeigt sich, dass Epa1A^{CBL2Epa9} zudem Glykanliganden mit terminalem β 1-4-verknüpftem Galactoserest und endständiger α 1-4-verknüpfte Galactose bindet, was auch für Epa9A beobachtet werden kann. Demnach kann durch den Austausch der CBL2-Region der Epa1A-Domäne durch die von Epa9A zwar eine Verschiebung, jedoch konnte kein vollständiger Spezifitätswechsel der Ligandenspezifität hin zum Ligandenbindungsprofil von Epa9A erreicht werden.

Im Fall von Epa9A^{CBL2Epa1} verschiebt sich die Ligandenspezifität im Vergleich zu Epa9A deutlich hin zu β 1-3-verknüpften Galactosiden. Die erhaltenen Bindungsspezifitätsprofile zeigen eine hohe Ähnlichkeit zu denen der unveränderten Epa1A-Domäne. Für Epa9A^{CBL2Epa1} kann durch Austausch der CBL2-Region demnach ein Spezifitätswechsel erzeugt werden. Bei Betrachtung der 20 % Grenze fällt jedoch auf, dass zu einem Drittel auch andere Glykane ohne terminalen Galactoserest gebunden werden. Dies spricht dafür, dass die bevorzugten Liganden nur schwach gebunden werden, und demnach der CBL2-Austausch zwar zu einem Spezifitätswechsel führt, dieser jedoch mit einem Affinitätsverlust einhergeht. Dies konnte bereits durch die verminderte Adhäsion von Epa9A^{CBL2Epa1} an Caco-2 Zellen und Agar beobachtet werden.

Epa1A und Epa3A zeigen bei Betrachtung der 50 % Grenze der Ligandenbindungsprofile dieselbe Spezifität, weshalb zu erwarten wäre, dass durch den Austausch der CBL2-Region kein Spezifitätsunterschied entsteht. Anhand der Bindungsspezifitätsprofile von Epa3A^{CBL2Epa1} zeigt sich jedoch, dass Epa3A^{CBL2Epa1} bevorzugt Bindung zu sulfatierten und β 1-3-verknüpften Galactosiden vermittelt. Der Austausch der CBL2-Region von Epa3A durch die von Epa1A führt also nicht zu einem Spezifitätswechsel. Der alleinige Austausch von drei Aminosäuren innerhalb der Ligandenbindungstasche erzeugt eine EpaA-Domäne mit eigener Ligandenspezifität, die keine Ähnlichkeit zu den Ligandenbindungsprofilen aufweist, die für Epa1A und Epa3A ermittelt wurden. Zudem vermittelt Epa3A^{CBL2Epa1} voraussichtlich verringerte Bindungsstärken, da es wie Epa9A^{CBL2Epa1} zu einem großen Anteil Glykan-Liganden ohne terminalen Galactoserest bindet. Dies konnte bereits bei der verminderten Adhäsion an Caco-2 Zellen und Agar beobachtet werden konnte.

Für Epa3A^{CBL2Epa2} konnte keine spezifische Bindung zu terminalen Galactosiden beobachtet werden. Da bereits anhand der Bindungsspezifitätsprofile keine eindeutigen Signalpeaks beobachtet werden konnten, kann davon ausgegangen werden kann, dass Epa3A^{CBL2Epa2}, wie Epa2A, nicht mehr zur Bindung befähigt ist oder nur sehr schwache Bindung vermittelt, sodass keine Signalpeaks mittels *Glycan Array Screening* gemessen werden können (Abbildung 69).

2.9.3 Bindung isolierter Disaccharide

Für die EpaA-Varianten sollte ebenfalls, wie in Abschnitt 2.3.4 beschrieben, die Bindung zu Disacchariden betrachtet werden, um Aussagen über die relativen Bindungsstärken zu treffen und den Einfluss des SekundärGlykans auf die Bindungsspezifität zu beurteilen (Abbildung 42, Abbildung 43, Abbildung 44). Dabei zeigt Epa9A^{CBL2Epa1} eine klare Bevorzugung von Disacchariden mit Galβ1-3-Terminus, was auch für Epa1A und Epa9A beobachtet werden kann. Zwar zeigt das Bindungsprofil von Epa9A^{CBL2Epa1} auch weitere Signalpeaks, die aber aufgrund der geringen maximalen Fluoreszenzintensität als Hintergrundrauschen anzusehen sind. Bei der Bindungsspezifitätsmessung von Epa1A^{CBL2Epa9} entstanden hingegen Signalpeaks mit einer hohen Fluoreszenzintensität. Auch Epa1A^{CBL2Epa9} zeigt Bindung an Disaccharide mit Galβ1-3-Terminus. Es können noch weitere Gemeinsamkeiten aber auch Unterschiede zu den Bindungsspezifitätsprofilen der A-Domänen von Epa1 und Epa9 festgestellt werden. So vermittelt Epa9A beispielsweise vergleichbar starke Bindungen zu Disacchariden mit terminaler sulfatierter Galactose, β1-3-Verknüpfung und β1-4-Verknüpfung, zudem wurden Disaccharide mit endständiger α-verknüpfter Galactose gebunden. Auch Epa1A^{CBL2Epa9} vermittelt Adhäsion zu vielen Galactosid-Klassen, jedoch wurden Galactoside mit β1-4-Verknüpfung schwächer gebunden. Letzteres konnte auch für das Bindungsprofil von Epa1A beobachtet werden konnte. Des Weiteren werden endständige Galactoside, die am sechsten C-Atom sulfatiert sind, sowohl von Epa1A und Epa9A als auch von Epa1A^{CBL2Epa9} gebunden, wobei im Fall von Epa1A^{CBL2Epa9} eine deutliche Bevorzugung dieser Galactosid-Klasse gemessen werden konnte. Epa1A^{CBL2Epa9} vermittelte also Bindung an dieselben Disacchariden wie Epa1A und Epa9A, weist aber eine klare Präferenz zu Disacchariden mit endständiger, sulfatierter Galactose auf (Abbildung 42).

Bindungsprofile die durch Untersuchung der Bindung von Epa1A, Epa1A^{CBL2Epa9}, Epa9A^{CBL2Epa1} und Epa9A an alle 94 Disaccharide, die auf dem Glykan-Chip MPA V5.1 präsentiert werden, erhalten wurden. Die verschiedenen Galactosid-Typen sind durch unterschiedlich farbige Boxen hervorgehoben. Die Bindungsaffinität zu den einzelnen Disacchariden spiegelt sich in der Höhe der relativen Fluoreszenz wider. Die Werte entsprechen den Fluoreszenzintensitäten die bei einer Proteinkonzentration von 200 µg/ml erhalten wurden.

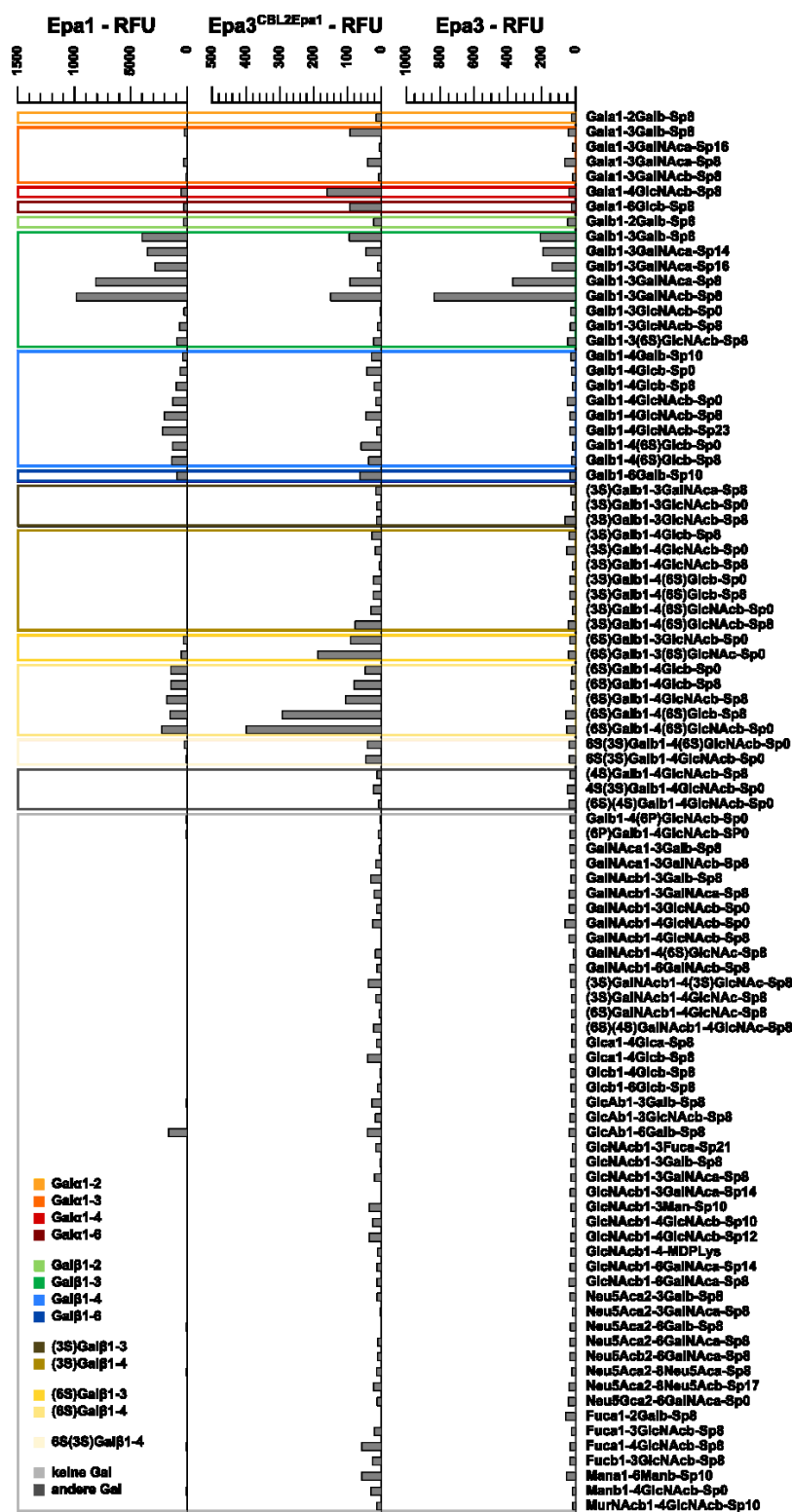


Abbildung 43: Bindung von Disacchariden durch die Epa3A^{CBL2Epa1}-Domäne im Vergleich zu den A-Domänen von Epa1 und Epa3.

Bindungsprofile die durch Untersuchung der Bindung von Epa1A, Epa3A^{CBL2Epa1} und Epa3A an alle 94 Disaccharide, die auf dem Glykan-Chip MPA V5.1 präsentiert werden, erhalten wurden. Die verschiedenen Galactosid-Typen sind durch unterschiedlich farbige Boxen hervorgehoben. Die Bindungsaffinität zu den einzelnen Disacchariden spiegelt sich in der Höhe der relativen Fluoreszenz wider. Die Werte entsprechen den Fluoreszenzintensitäten die bei einer Proteinkonzentration von 200 µg/ml erhalten wurden.

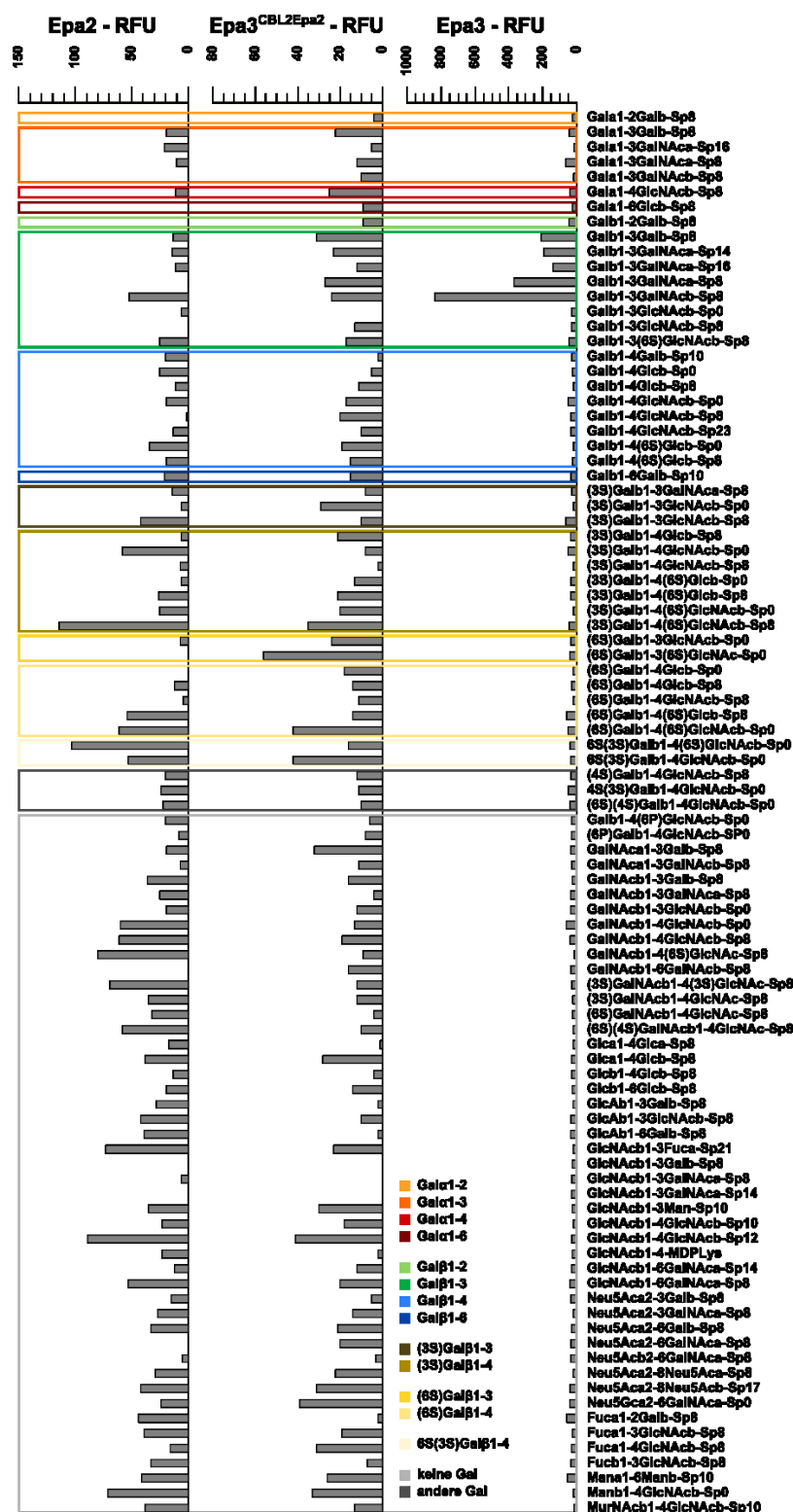


Abbildung 44: Bindung von Disacchariden durch die Epa3A^{CBL2Epa2}-Domäne im Vergleich zu den A-Domänen von Epa2 und Epa3.

Bindungsprofile die durch Untersuchung der Bindung von Epa2A, Epa3A^{CBL2Epa2} und Epa3A an alle 94 Disaccharide, die auf dem Glykan-Chip MPA V5.1 präsentiert werden, erhalten wurden. Die verschiedenen Galactosid-Typen sind durch unterschiedlich farbige Boxen hervorgehoben. Die Bindungsaffinität zu den einzelnen Disacchariden spiegelt sich in der Höhe der relativen Fluoreszenz wider. Die Werte entsprechen den Fluoreszenzintensitäten die bei einer Proteinkonzentration von 200 µg/ml erhalten wurden.

Demnach wird durch den Austausch der CBL2-Region eine EpaA-Domäne erzeugt, die eine eigene Ligandenspezifität vermittelt, welche aber ähnlich zu der von Epa1A und Epa9A ist. Zudem ist aufgrund des hohen Signal-Rausch-Verhältnis des Bindungsspezifitätsprofils von Epa1A^{CBL2Epa9} davon auszugehen, dass diese A-Domäne hohe Bindungsstärken vermittelt, was bereits anhand der starken Adhäsion an Caco-2 Zellen und Agar beobachtet werden konnte (Abbildung 40).

Epa3A^{CBL2Epa1} zeigt wie Epa1A und Epa3A Bindung zu Galβ1-3GalNAc und Galβ1-3Gal. Zudem werden Disaccharide mit terminalem α1-3, α1-4, sowie α1-6 verknüpftem Galactoserest durch Epa3A^{CBL2Epa1} gebunden, was weder für Epa1A noch für Epa3A gemessen wurde. Disaccharide mit endständiger Galactose, die am sechsten C-Atom sulfatiert ist, werden von Epa3A^{CBL2Epa1} jedoch bevorzugt gebunden. Dieselben Disaccharide werden auch von Epa1A gebunden, jedoch im Vergleich zu terminalen β1-3-verknüpften Galactosiden viermal schwächer (Abbildung 43). Demnach wird für Epa3A^{CBL2Epa1}, wie auch für Epa1A^{CBL2Epa9}, durch Austausch der CBL2-Region eine EpaA-Domäne mit eigener Ligandenspezifität erzeugt, welche aber ähnlich zu den A-Domänen von Epa1A und Epa3A ist.

Epa3A^{CBL2Epa2} zeigt weder Bindung an terminale Galactoside noch an andere Glykane (Abbildung 41, Abbildung 44). Voraussichtlich vermittelt Epa3A^{CBL2Epa2} wie Epa2A keine oder nur eine sehr schwache Bindung, da keine spezifischen Signalpeaks gemessen wurden. Da Epa3A^{CBL2Epa2} in hohen Mengen an reinem Protein gewonnen werden konnte, lässt sich die schwache Bindung nicht auf eine schlechte Expression und die eventuell dadurch resultierenden geringen Mengen an aktivem Protein zurückführen. Demnach scheint der CBL2-Austausch im Fall von Epa3A^{CBL2Epa2} zu einem Funktionsverlust zu führen.

Zusammenfassend erzeugt der Austausch der vier Aminosäuren der CBL2-Region eine Veränderung der Bindungsspezifität, jedoch erfolgte kein kompletter Spezifitätswechsel. Die Profile von Epa1A^{CBL2Epa9}, Epa9A^{CBL2Epa1}, Epa3A^{CBL2Epa1} und Epa3A^{CBL2Epa2} wiesen im Allgemeinen Eigenschaften beider Vorläufer auf und zeigten sogar völlig neue Präferenzen. Demnach sind voraussichtlich weitere Bereiche der EpaA-Domänen an der Vermittlung der Spezifität und der Bindungsstärke beteiligt, die es in Zukunft zu identifizieren gilt.

2.9.4 Bindung isolierter Monosaccharide

Zuletzt wurde auch für die EpaA-Varianten die Bindung zu den 27 Monosacchariden, die auf dem Glykan Chip präsentiert werden, untersucht, um die postulierte Bevorzugung von Galactose durch die Epa-Proteine zu überprüfen. Dabei fiel auf, dass lediglich Epa1A^{CBL2Epa9} Galactose klar bevorzugte (Abbildung 45).

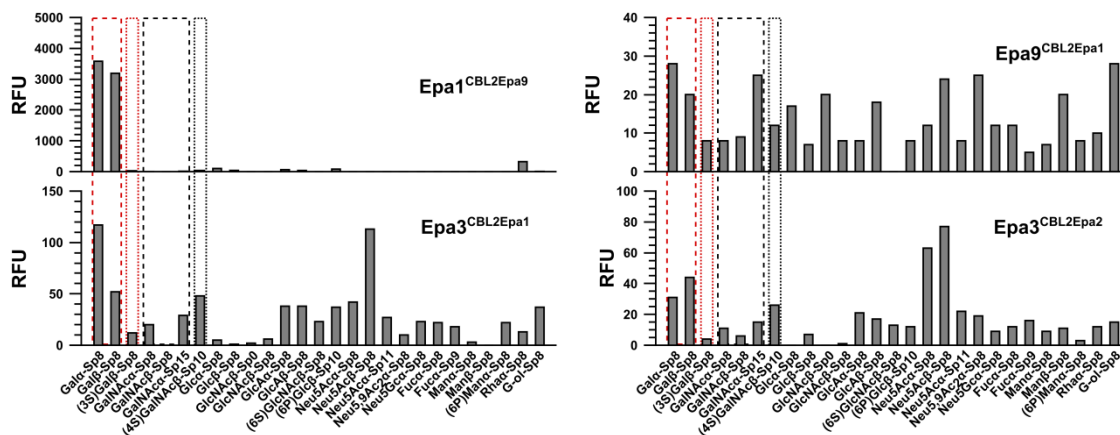


Abbildung 45: Bindung von Monosacchariden durch EpaA CBL2-Austauschvarianten.

Bindungsprofile die durch Untersuchung der Bindung von Epa1A^{CBL2Epa9}, Epa9A^{CBL2Epa1}, Epa3A^{CBL2Epa1} und Epa3A^{CBL2Epa2} an die 27 Monosaccharide (x-Achse), die auf dem Glykan Chip MPA V5.1 präsentiert werden, erhalten wurden. Galactoseeinheiten sind zusätzlich hervorgehoben (Gal in rot und GlcNAc in grau). Die Werte entsprechen den Fluoreszenzintensitäten die mit einer Proteinkonzentration von 200 µg/ml erhalten wurden.

Diese Beobachtung würde die Vermutung unterstützen, dass die CBL2-Austauschvarianten Epa9A^{CBL2Epa1}, Epa3A^{CBL2Epa1} und Epa3A^{CBL2Epa2} verminderte Bindungsstärken vermitteln. Zudem konnte beobachtet werden, dass Epa1A^{CBL2Epa9}, wie alle anderen EpaA-Domänen, nicht an Galactose adhärert, die am dritten C-Atom sulfatiert ist. Demnach kann davon ausgegangen werden, dass für diese Art sulfatierter Galactoside kein Platz innerhalb der Ligandenbindungstasche ist.

3 Diskussion

Der kommensalistisch lebende Pilz *C. glabrata* gilt nach *C. albicans* als zweithäufigster Erreger von pilzlichen Infektionen des Menschen und ist aufgrund seiner natürlichen Resistenz gegenüber gebräuchlichen Antimykotika von hoher medizinischer Relevanz (Pfaller & Diekema, 2007, Zepelin, 2007). *C. glabrata* ist nicht wie sein Verwandter *C. albicans* in der Lage, Hyphen auszubilden, und auch die Produktion von Proteinasen und Phospholipasen hat aller Voraussicht nach keinen Einfluss auf die Pathogenität des Pilzes. Demnach ist die Untersuchung weiterer Virulenzfaktoren für die Entwicklung neuer Antimykotika von hohem Interesse, wobei ein besonderes Augenmerk auf den etwa 70 GPI-verankerten Adhäsinen liegt (Csank & Haynes, 2000, Saville, *et al.*, 2006). Im Falle des untersuchten *C. glabrata* Stammes CBS138 zählen 17 dieser GPI-verankerten Adhäsine zur Epa-Familie, die maßgeblich an der Kolonisierung des Wirtes beteiligt ist (de Groot, *et al.*, 2013). Bisher war mit Ausnahme von Epa1 nur wenig über die Funktion der EPA-Gene bekannt. Um weitere Informationen bezüglich der Funktion und Bindungsspezifität zu erlangen, wurde in dieser Arbeit die komplette Epa-Familie untersucht.

Da der EpaA-Domäne die Ausübung der Adhäsionsfunktion zugeschrieben wird, wurde der Fokus ausschließlich auf diese Domäne gelegt, um eine bessere Vergleichbarkeit der aktiven Domänen zu ermöglichen. Die vorliegende Arbeit gibt erstmals Auskunft über Bindungsaffinität und Ligandenspezifität einer kompletten Multigen-Familie, sowie weiterführende strukturelle Einblicke anhand proteinkristallographischer Daten. Abgerundet wird die Arbeit durch Betrachtung des *in vivo* Bindungsverhaltens derselben A-Domänen mit Hilfe der nah verwandten Bäckerhefe als Modellorganismus.

3.1 Alle EpaA-Domänen sind PA14/Flo5-ähnliche Lektine mit hoher struktureller Ähnlichkeit und konservierten Elementen für die Ligandenbindung

Die A-Domäne von Epa1 gehört wie Flo5A zur Familie der PA14/Flo5-ähnlichen Lektine, welche durch eine β -Sandwich-Kernstruktur und das sogenannte DcisD-Motiv charakterisiert ist (Veelders, *et al.*, 2010, Meatre-Reyna, 2011). Mittels

bioinformatischer Analysen der untersuchten EpaA-Domänen konnten diese in die gleiche Familie eingeordnet werden. Zudem zeigten sich anhand des strukturbasierten Sequenzalignments verschiedene konservierte Strukturelemente, deren Funktion in der vorliegenden Arbeit genauer untersucht wurde. Hierzu zählt zum einen das *DcisD*-Motiv, das zusammen mit einem konservierten Asparaginrest der CBL2-Region, ein Calciumion innerhalb der Bindungstasche komplexiert. Auch der Tryptophanrest in L3 ist innerhalb der kompletten Epa-Familie konserviert, sowie zwei Cysteine, welche die beiden Schleifen L1 und L2 über Disulfidbrückenbindung miteinander verknüpfen (Abbildung 12, Abbildung 46).

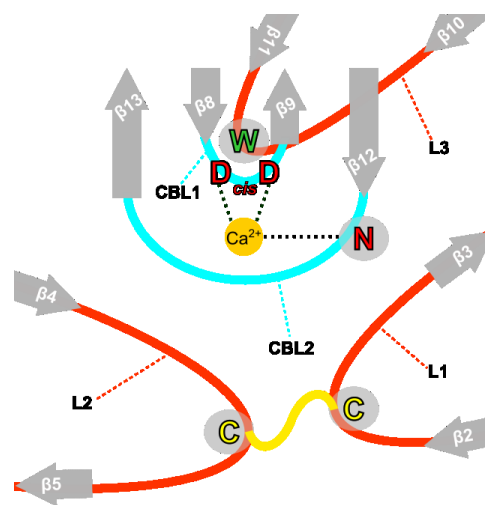


Abbildung 46: Konservierte Strukturelemente der Epa-Familie.

Bindungstasche der EpaA-Domänen mit verschiedenen konservierten Strukturelementen, die zur Bindungs- und Spezifitätsvermittlung beitragen. Gezeigt sind die Calcium-Bindungsschleifen (cyan) und die weiteren hypervariablen Bereiche L1, L2 und L3. Zusätzlich dargestellt sind konservierte Cysteine, die eine Disulfidbrücke zwischen L1 und L2 ausbilden (gelb) und der Tryptophanrest in L3 (grün). Das *DcisD*-Motiv und der Asparaginrest (rot) komplexieren ein Calciumion in der Bindungstasche.

3.1.1 Das *DcisD*-Motiv vermittelt Ligandenbindung durch Komplexierung eines Calciumions

Durch die Strukturlösung der beiden A-Domänen von Epa6 und Epa9 konnte die *cis*-Peptidbindung zwischen den beiden Asparaginsäuren der CBL1-Region erneut strukturell nachgewiesen werden. Auch für Epa6A und Epa9A zeigt sich, dass neben dem *DcisD*-Motiv der konservierte Asparaginrest der CBL2-Region an der Komplexierung des Calciumions beteiligt ist (Abbildung 34, Abbildung 35, Abbildung 47). Bei den *in vivo* Untersuchungen der Epa1A^{D165A}-Domäne, welche eine Mutation der Asparaginsäure an Position 165 zu einem Alanin aufweist, konnte wie erwartet weder eine Bindung der Hefezellen an Caco-2 Epithelzellen noch an Agar

gemessen werden. Der *S. cerevisiae* Stamm hingegen, der die unveränderte Epa1A-Domäne an seiner Oberfläche präsentiert, vermittelt eine starke Adhäsion an Caco-2 Zellen und lässt sich nicht durch starkes Waschen von der YPD-Agar-Platte lösen (Abbildung 39).

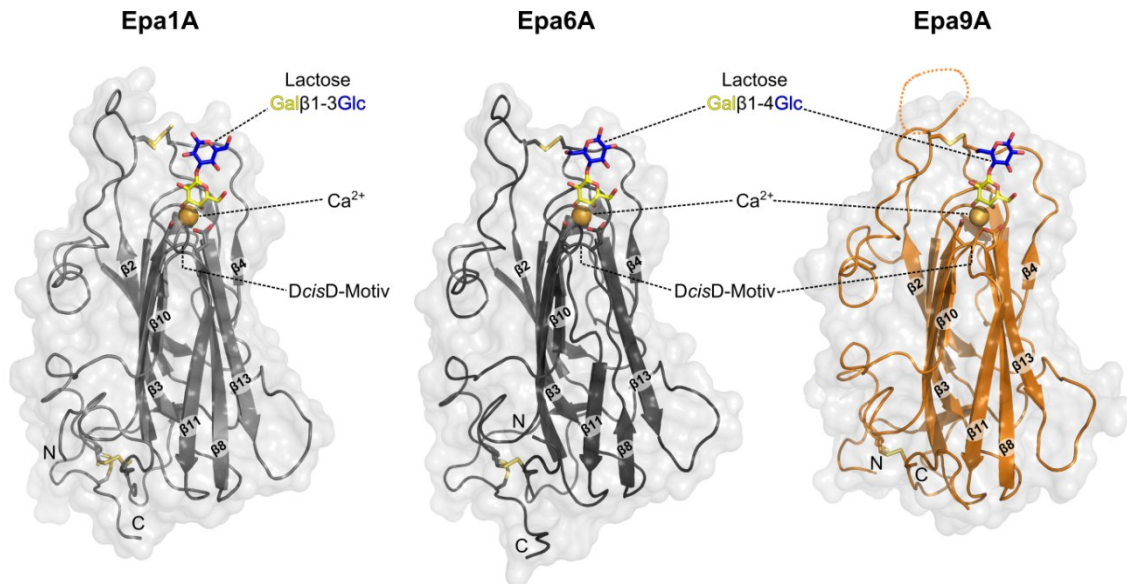


Abbildung 47: Vergleich der atomaren Strukturen von Epa1A, Epa6A und Epa9A.

Die Strukturen der gelösten EpaA-Domänen Epa1A (links), Epa6A (Mitte) und Epa9A (rechts) im Vergleich. Bei allen A-Domänen sind N- und C-Terminus über zwei Disulfidbrücken miteinander verknüpft. Zwischen L1 und L2 kann ebenfalls in allen Strukturen eine Disulfidbrückenbindung gefunden werden. Auch das DcisD-Motiv, sowie das Calciumion kann in allen Strukturen beobachtet werden. Alle A-Domänen wurden in Anwesenheit von Lactose co-kristallisiert, die auch in den Strukturen von Epa6A und Epa9A identifiziert werden konnte, wohingegen in Epa1A eine β 1-3 verknüpfte Verunreinigung gefunden wurde. Die Farbgebung des Liganden wurde gemäß CFG-Nomenklatur gewählt.

Des Weiteren konnte bei der biochemischen Untersuchung der Epa1A^{D165A}-Domäne mittels MST-Messung ebenfalls keine Bindung an das T-Antigen gemessen werden. Zusammenfassend wird durch Mutation des DcisD-Motivs kein Calciumion mehr komplexiert, weshalb keine Glykane mehr gebunden werden können. Interessant wäre noch zu beobachten, welche Auswirkung die Mutation des Asparagins an Position 225 zu einem Alanin hätte. In der Arbeit von Maik Veelders sollte dies bereits untersucht werden, da aber Flo5A-Domänen, die eine Mutation des Asparagins (N224) zu einem Alanin aufweisen, sich nicht rekombinant überproduzieren ließen, ist der Beitrag dieses Aminosäurerests zur Komplexierung des Calciumion noch nicht untersucht (Veelders, 2012).

3.1.2 Die aromatischen Bestandteile des Tryptophans in L3 vermitteln Bindung an endständige Galactoside

Eine weitere Auffälligkeit innerhalb der Epa-Familie ist, dass das Tryptophan in L3 in allen EpaA-Domänen konserviert ist (Abbildung 12). Voraussichtlich werden Glykane innerhalb der Bindungstasche durch das Tryptophan abgedeckt und somit stabilisiert (Maestre-Reyna, *et al.*, 2012). Dies konnte anhand der Kristallstruktur der Epa1A-Domäne sowie in den Strukturen der A-Domänen von Epa6 und Epa9 beobachtet werden (Abbildung 34, Abbildung 35). Das Calciumionon innerhalb der Bindungstasche wird dabei durch die 3- und 4-Hydroxylgruppe eines terminalen Galactoserests koordiniert, wodurch es im Vergleich zur von Flo5A gebundenen Mannose, zu einer orthogonalen Verkipfung der Galactose kommt (Veelders, *et al.*, 2010). Aufgrund der parallelen Orientierung der Galactose zum Tryptophanrest der L3 Schleife, kommt es zu einer Stabilisierung des hydrophoben Anteils der Galactose (Maestre-Reyna, *et al.*, 2012). Gleichzeitig kann dadurch eine engere Bindungstasche beobachtet werden, die mit einer größeren Interaktionsoberfläche einhergeht, was unter anderem auch eine bessere Abschirmung des Liganden bewirkt. Durch die stärkere Interaktion der EpaA-Domänen zum Liganden lässt sich erklären, dass für die EpaA-Domänen Bindungskonstanten im mikromolaren Bereich gemessen wurden, wohingegen Flo5A lediglich Bindungsstärken im millimolaren Bereich vermittelt (Veelders, *et al.*, 2010, Maestre-Reyna, *et al.*, 2012). In der Arbeit von Manuel Maestre-Reyna wurde bereits die Bindung der Epa1A^{W198A}-Domäne zum T-Antigen mittels ITC-Messung untersucht, wobei keine Bindung ermittelt wurde (Maestre-Reyna, *et al.*, 2012). In der vorliegenden Arbeit wurde das Adhäsionsverhalten derselben A-Domäne an Caco-2 Zellen und Agar getestet, wobei kein lösliches Protein, sondern *S. cerevisiae* Stämme verwendet wurden, welche die Epa1A^{W198A}-Domänen auf ihrer Oberfläche präsentieren. Auch hier konnte keine Adhäsion an Caco-2 Zellen oder Agar vermittelt werden. Zudem wurden noch zwei weitere Epa1A-Domänen betrachtet, bei denen W198 zu einem Histidin oder einem Tyrosin mutiert wurde, um den Beitrag der aromatischen Indolbestandteile des Tryptophans zur Ligandenbindung zu ermitteln. Der Austausch des Tryptophans mit Indol-Seitenkette in ein Histidin mit Imidazolring oder ein Tyrosin mit einem Aromaten, bestehend aus sechs Kohlenstoffatomen, könnte im Prinzip eine Änderung der Interaktion mit dem Liganden bewirken (Abbildung 48). An Agar konnte kein

Unterschied des adhäsiven Wachstums zwischen den *S. cerevisiae* Stämmen, die Epa1A^{W198H}, Epa1A^{W198Y} oder die unveränderte Epa1A-Domäne an ihre Oberfläche präsentieren, beobachtet werden. Zudem vermittelten die beiden A-Domänen Epa1A^{W198H} und Epa1A^{W198Y} starke Adhäsion der Hefezellen an Caco-2 Epithelzellen. Für die A-Domäne Epa1A^{W198Y} konnte sogar eine Adhäsion von 67 % der Hefezellen an Caco-2 Zellen beobachtet werden. Da die drei *S. cerevisiae* Stämme, die Epa1A^{W198H}, Epa1A^{W198Y} und Epa1A auf ihrer Oberfläche präsentieren alle starke Adhäsion an Caco-2 Zellen vermitteln, die sich nicht signifikant voneinander unterscheidet, kann von einer vergleichbaren Bindung ausgegangen werden (Abbildung 39).

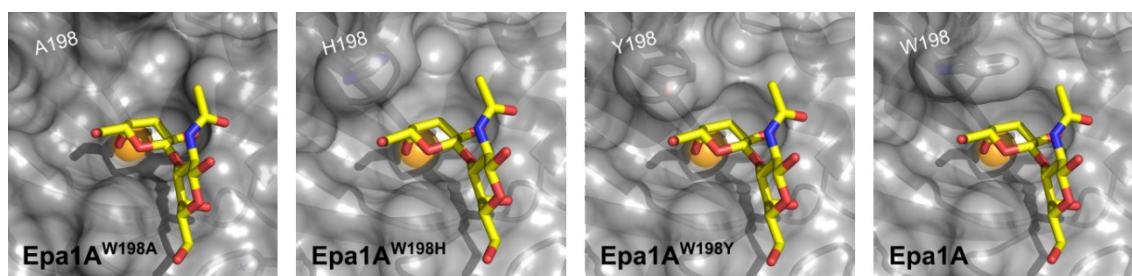


Abbildung 48: Vergleich der Bindungstaschen der Epa1A-Domänen mit einer Mutation in W198.

Dargestellt sind die Oberfläche der Bindungstasche von Epa1A mit T-Antigen als Ligand (rechts), sowie die Oberfläche der einzelnen Epa1A-Mutanten, wobei diese durch Mutation mittels PyMOL generiert wurden. Die Bindungstasche von Epa1A^{W198A} ist sehr offen und zugänglich für Solventien, wohingegen die Bindungstaschen der anderen Mutanten, sowie der unveränderten Epa1A-Domäne, deutlich begrenzter sind.

Um die von Epa1A^{W198H}, Epa1A^{W198Y} und Epa1A vermittelten Bindungsstärken besser vergleichen zu können, wäre es von hohem Interesse, Bindungskonstanten mit aufgereinigtem Protein zu ermitteln. Anhand der K_D -Werte für Epa1A, Epa1A^{W198H} und Epa1A^{W198Y} ließe sich der Beitrag der aromatischen Bestandteile des Tryptophans zur Ligandenbindung genauer bestimmen und unterscheiden. Zudem bleibt die Frage offen, ob Epa1A^{W198A} zwar nicht mehr zu Stabilisierung des hydrophoben Galactosanteil befähigt ist, aber trotzdem vergleichbare, tausendfach geringere Bindungsstärken wie die A-Domäne von Flo5 vermittelt. Dass der Tryptophanrest der L3 Region innerhalb der kompletten Epa-Familie konserviert ist, würde dafür sprechen, dass alle EpaA-Domänen terminale Galactoside binden, da so aufgrund der parallelen Ausrichtung zum Tryptophans die bereits beschriebene Stabilisierung ermöglicht wird. Dies konnte anhand der CFG-Profile der EpaA-Domänen aus Gruppe 1 beobachtet werden, deren Mitglieder alle Galactose als terminalen Glykanrest binden. Alle

EpaA-Domänen der Gruppe 2 hingegen binden, mit Ausnahme von Epa11A, Glykane die keine strukturelle Verwandtschaft zueinander besitzen, was eher dafür spricht, dass diese Proteine entweder keine Bindung oder nur sehr schwache Bindung vermitteln. Ob die unspezifischen CFG-Profile mit der schwachen rekombinanten Überproduktion der EpaA-Domänen aus Gruppe 2 und der dadurch möglicherweise resultierenden geringen Menge an aktivem Protein im Zusammenhang steht, wäre noch zu überprüfen. Hierzu würde sich zum einen die Ermittlung von Ligandenbindungskonstanten eignen, da jedoch für einen Großteil der EpaA-Domänen der Gruppe 2 nur geringe Mengen an reinem Protein zu Verfügung stehen, ist dies vorerst nicht durchführbar. Es wäre demzufolge zu testen, ob das unlösliche Protein in Form von *inclusion bodies* vorliegt, um anschließend geeignete Rückfaltungsbedingungen zu finden. Als weitere Möglichkeit kämen Bindungstests mittels Rasterkraftmikroskopie und *S. cerevisiae* Zellen, welche die EpaA-Domänen auf ihrer Oberfläche präsentieren, in Frage. Hierbei befestigt man eine Hefezelle auf einer Nadel und drückt diese zunächst auf einen Glas-Chip, auf welchem putative Liganden immobilisiert sind. Über die Kraft, die beim Ablösen der Hefezelle vom Glas-Chip aufgebracht werden muss, lässt sich die Bindungsstärke ermitteln. Jedoch stehen die Glas-Chip derzeit nicht zu Verfügung. Des Weiteren würde sich qualitatives *Glycan Array Screening* mit *S. cerevisiae* Stämmen, die EpaA-Domänen auf ihrer Oberfläche präsentieren, anbieten. Dies konnte bereits in vorherigen Arbeiten erfolgreich durchgeführt werden (Zupancic, *et al.*, 2008). Bei der Verwendung eines eukaryotischen Organismus für die rekombinante Expression, ist die Wahrscheinlichkeit einer Fehlfaltung aufgrund gleicher posttranslationaler Modifikationen, sowie Proteinprozessierungs- und Sekretionsmechanismen deutlich geringer. Diese Methode muss jedoch noch für die verwendeten *S. cerevisiae* Stämme etabliert werden. Zukünftig könnte diese Herangehensweise aber hilfreiche Informationen zur Bewertung der unaussagekräftigen Bindungsprofile geben, ohne neue Expressions- und Aufreinigungsstrategien zu entwickeln zu müssen, die nicht mit Sicherheit von Erfolg gekrönt sind. Zum jetzigen Zeitpunkt kann also noch nicht definitiv ausgeschlossen werden, dass die A-Domänen der Gruppe 2 nicht doch eine spezifischere Ligandenbindung zeigen und welche Bindungsstärken in diesem Fall vermittelt werden.

3.1.3 Die Verknüpfung von L1 mit L2 trägt zur Bindungsvermittlung der EpaA-Domänen bei

Neben dem Tryptophan in L3, dem *DcisD*-Motiv, sowie dem Asparagin der CBL2-Region konnte beobachtet werden, dass zusätzlich sechs Cysteine innerhalb der A-Domänen der verschiedenen Epa-Proteine konserviert sind (Abbildung 12). Im Fall von Epa1A sind C50 und C179 miteinander verknüpft, sowie C180 mit C263. Diese konnte zudem in der Kerndomäne der Kristallstruktur von Flo5A und den A-Domänen von Epa6 und Epa9 beobachtet werden, und sorgen für eine Verbindung von N- und C-Terminus, wodurch die beiden Termini an die B-Domäne geknüpft sind (Abbildung 47). Aufgrund dieser Fixierung wird die eigentliche Bindungstasche in der entgegengesetzten Richtung präsentiert, die sich möglichst weit von der B-Domäne und der Zellwand entfernt befindet, wodurch die Bindungstasche für die Bindung des Substrats gut zugänglich ist. Zudem werden die A-Domänen durch die Verknüpfung ihrer N- und C-Termini dichter gepackt und dadurch stabilisiert. Die beiden anderen Cysteine C78 und C119, die ebenfalls innerhalb der EpaA-Familie konserviert sind, verbinden die beiden Schleifen L1 und L2 miteinander (Abbildung 33, Abbildung 47). Aufgrund dieser Fixierung wird davon ausgegangen, dass die Bindungstasche zum einen vor Solvenzeinflüssen abgeschirmt ist, und die beiden Schleifen L1 und L2 dadurch in der Lage sind, mit putativen Liganden zu interagieren, um sowohl Spezifität, als auch die Bindungsstärke zu beeinflussen. Um dies zu überprüfen, wurde die Adhäsion von Hefezellen betrachtet, die die Epa1A^{C78S}-Domäne auf ihrer Oberfläche präsentieren. Bei Epa1A^{C78S} wurde das Cystein an Position 78 durch ein Serin ausgetauscht, wodurch die L1-L2-Verbindung unterbrochen wird. Die Mutation in ein Serin wurde gewählt, um einen möglichst ähnlichen Austausch bezüglich Ladung und räumlicher Anordnung zu gewährleisten. Bei den Adhäsionstests zeigte der *S. cerevisiae* Stamm, der Epa1A^{C78S} auf seiner Oberfläche präsentiert, eine schwache Adhäsion, die vergleichbar zu der des Kontrollstammes ist, welcher keine A-Domäne auf seiner Oberfläche präsentiert (Abbildung 39). Zudem konnte kein adhäsives Wachstum an Agar beobachtet werden (Abbildung 39). Demnach hat die Fixierung der beiden Schleifen L1 und L2 eine starke Auswirkung auf die Bindung, die ausgeprägter als die Stabilisierung terminaler Galactoside durch den Tryptophanrest in L3 ist. Jedoch sind auch hier zusätzlich *in vitro* Bindungsstudien von hohem Interesse, um zu beurteilen inwieweit L1 und L2 an der Spezifitätsvermittlung beteiligt sind, oder ob sich

der beobachtete Effekt lediglich auf eine geringere Interaktionsfläche der Bindungstasche und somit einer schwächeren Bindung, beziehungsweise eine geringere Abschirmung vor Solventien zurückführen lässt.

3.2 Spezifitätsvermittelnde Strukturelemente innerhalb der Epa-Familie

Das Hauptaugenmerk der vorliegenden Arbeit lag auf der Charakterisierung aller 17 EpaA-Domänen des *C. glabrata* Stamm CBS138 sowie der Identifizierung von Strukturelementen, welche die Spezifität der Ligandenbindung vermitteln. Anhand der strukturbasierten Sequenzanalyse konnten bereits konservierte Strukturelemente identifiziert und anschließend deren Funktion untersucht werden. Zudem konnte die strukturelle Verwandtschaft der EpaA-Domänen bestimmt werden, welche nun in Zusammenhang mit der funktionsbasierten Einteilung der EpaA-Domänen gebracht werden kann, um anschließend Rückschlüsse auf spezifitätsvermittelnde Bereiche ziehen zu können.

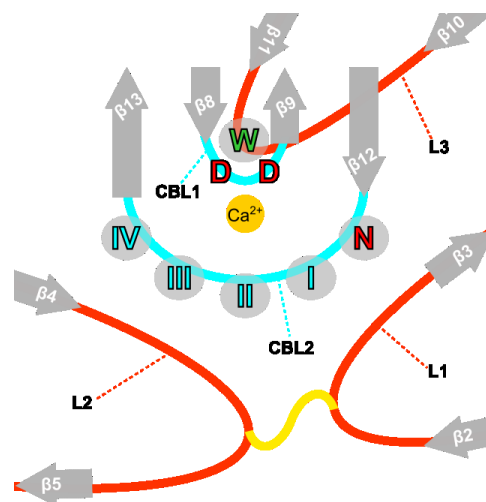


Abbildung 49: Modell der Bindungstasche der EpaA-Domänen.

Bindungstasche der EpaA-Domänen mit verschiedenen Strukturmotiven, die zur Bindungs- und Spezifitätsvermittlung beitragen. Gezeigt sind die Calcium-Bindungsschleifen (cyan) sowie die weiteren hypervariablen Bereiche L1, L2 und L3. Zusätzlich dargestellt sind konservierte Cysteine, die eine Disulfidbrücke zwischen L1 und L2 ausbilden (gelb) sowie der Tryptophanrest in L3 (grün). Das *DcisD*-Motiv und der Asparaginrest (rot) komplexieren ein Calciumion in der Bindungstasche.

Des Weiteren ermöglichte die Strukturlösung der A-Domänen von Epa6 und Epa9, unter zusätzlicher Verwendung der Epa1A-Struktur, die Modellierung der Struktur von weiteren EpaA-Domäne mit Hilfe des Programm *EasyModeller4.0*. Der Vergleich der

gewonnenen Informationen hilft bei der Identifizierung von spezifitätsvermittelnden Aminosäureresten und deren Funktion, und wird in den folgenden Unterkapitel für die verschiedenen EpaA-Domänen diskutiert. Für eine Vereinfachung der nachfolgenden Beschreibung bekommen die Aminosäuren der CBL2-Region innerhalb der Bindungstasche die Positionen von I bis IV zugeordnet, beginnend mit der Aminosäure, die dem konservierten Asparagin der CBL2-Region folgt (Abbildung 49) (Kobayashi, *et al.*, 1998, Zupancic, *et al.*, 2008, Maestre-Reyna, *et al.*, 2012).

3.2.1 Spezifitätsvermittlung von Epa1A, Epa7A, Epa3A und Epa22A (Gruppe 1A)

3.2.1.1 Epa7A vermittelt spezifischere Bindung als Epa1A

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Epa1A, Epa7A, Epa3A und Epa22A bevorzugt terminale, β 1-3-verkürfte Galactoside binden, und anhand der Bindungsspezifitätsprofile und der hierarchischen Clusteranalyse in die Gruppe 1A eingeteilt werden. Epa1A und Epa7A besitzen die gleiche CBL2-Region. Epa1A wurde bereits früher in Anwesenheit von Lactose (Gal β 1-4Glc) kristallisiert, wobei lediglich die β 1-3-verknüpfte Verunreinigung Gal β 1-3Glc innerhalb der Bindungstasche gefunden wurde (Maestre-Reyna, *et al.*, 2012). Durch die Seitenkette des Arginins an Position I werden die 2- und 3-Hydroxylgruppe der Galactose über Wasserstoffbrücken koordiniert, was die Präferenz zu terminalen Galactosiden, zusammen mit der Stabilisierung durch den konservierten Tryptophanrest der L3 Schleife erklärt (Abbildung 50). Die Glutaminsäure an Position II interagiert mit der 2-Hydroxylgruppe der terminalen Galactose, der glycosidischen Bindung und der 2-Hydroxylgruppe der sekundären Glucose. Zudem wird die Glutaminsäure in ihrer Position durch Wechselwirkung mit der Peptidbindung zwischen Glycin (118) und Cystein (119) der L2 Region stabilisiert. Des Weiteren konnte in vorherigen Arbeiten die Struktur der Epa1A-Domäne in Anwesenheit des T-Antigens gelöst werden. Dabei interagiert die sekundäre N-acetylierte Galactose, welche eine orthogonale Konformation im Vergleich zur vorher beschriebenen Glucose einnimmt, ebenfalls mit der Glutaminsäure an Position II (Maestre-Reyna, *et al.*, 2012). Das Tyrosin an Position III sowie die Asparaginsäure an Position IV scheinen nicht direkt mit dem gebundenen Liganden zu interagieren. Durch die L2 Schleife erfolgt jedoch eine Umschließung des Tyrosins, sodass es weiter in die Bindungstasche hereinragt, wodurch diese dichter gepackt wird.

Dadurch kommt es sowohl zu einer Vergrößerung der Interaktionsfläche, als auch zu einer Erhöhung der Spezifität, da mangels Platz innerhalb der Bindungstasche nicht beliebig viele verknüpfte terminale Galactoside gebunden werden können.

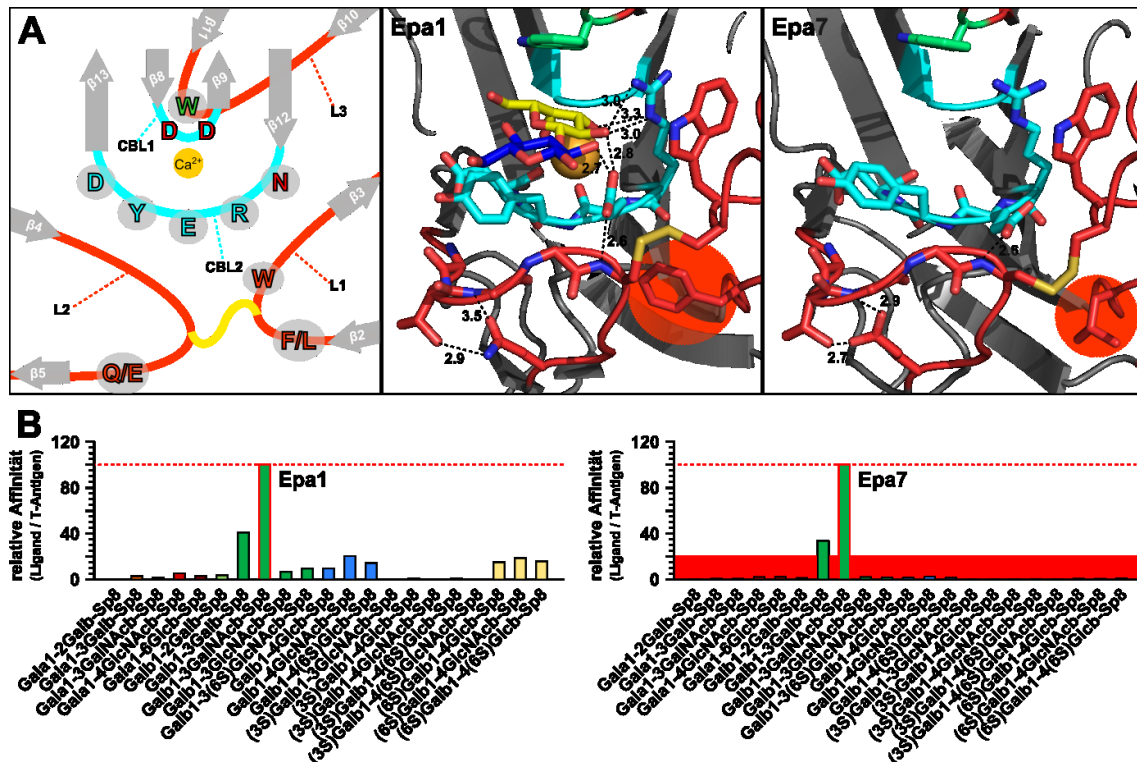


Abbildung 50: Bindungstaschen und Bindungsprofile von Epa1A und Epa7A.

A) Vereinfachte Darstellung der Bindungstasche von Epa1A und Epa7A. Die Aminosäuren der CBL2-Region sind abgebildet, sowie die Unterschiede zwischen Epa1 in den Schleifen L1 und L2 (Q/E und F/L). Mitte) Bindungstasche von Epa1A mit gebundener Galactose- β 1-3-Glucose, dabei sind die Abstände in Ångström angegeben, zudem sind das Glutamin in L2 (rot), sowie das Phenylalanin in L1 (rot) hervorgehoben. Die CBL1 und CBL2-Regionen (cyan), sowie der Tryptophanrest (grün) der L3-Schleife sind ebenfalls farblich hervorgehoben und in Stab-Darstellung gezeigt. Rechts) Modellierter Darstellung der Bindungstasche von Epa7A, wobei die Glutaminsäure in L2 sowie das Phenylalanin in L1 zusätzlich hervorgehoben sind. B) Bindung von Epa1A und Epa7A an Disaccharide, die β -Sp8 an den Glykan-Chip gebunden sind. Zudem sind alle Werte auf den Wert des T-Antigens (Gal β 1-3GalNAc) normiert, dem eine relative Affinität von 100 zugeordnet wurde. Die Galactosid-Klassen sind farblich hervorgehoben. Das Signal des T-Antigens ist rot umrandet. Die rot gestrichelte Linie gibt eine relative Affinität von 100 an.

Epa7A bindet ebenfalls β 1-3-verknüpfte terminale Galactose, aber trotz gleicher CBL2-Region wesentlich spezifischer. Es sind jedoch leichte Unterschiede innerhalb der Schleifen L1 und L2 zu beobachten. Zum einen weist Epa1A an Position 122 ein Glutamin auf, wohingegen Epa7A an dieser Stelle eine Glutaminsäure aufweist. Beide Aminosäuren können mit dem Threonin (T116) der L2-Schleife, welche das Tyrosin an Position III umschließt, interagieren, was eine leichte räumliche Änderung der Bindungstasche mit sich bringen könnte. Zudem ist im Fall von Epa1A direkt unter der

CBL2-Region ein Phenylalanin (F70) innerhalb der L1 Schleife lokalisiert, wohingegen Epa7A dort einen sterisch kleineren Leucinrest trägt, was ebenfalls Auswirkungen auf die Interaktionsfläche der Bindungstasche haben könnte und somit trotz gleicher direkter Umgebung die leicht verschiedenen Bindungsprofile der beiden A-Domänen erklären könnte (Abbildung 50). Des Weiteren konnten für Epa1A und Epa7A Bindungskonstanten zu verschiedenen Disacchariden ermittelt werden (Abbildung 30). Beide Proteine binden bevorzugt das β 1-3-verknüpfte T-Antigen. Halb so stark wird hingegen das β 1-4-verknüpfte *N*-Acetyl-D-lactosamin gebunden, was sich ebenfalls anhand der CFG-Bindungsprofile beobachten lässt (Abbildung 50). Beide Proteine zeigten eine etwa 8-fach geringere Bindung von α 1-3 Galactobiose, was auch anhand der CFG-Bindungsprofile beobachtet werden konnte. Lacto-*N*-biose (Gal β 1-3GlcNAc), welche wie das T-Antigen verknüpft ist wird von beiden A-Domänen vergleichbar wie α 1-3 Galactobiose gebunden. Diese Beobachtung könnte sich auf die Orientierung der 5-Hydroxylgruppe der sekundären Glucose zurückführen lassen, welche durch das Tyrosin an Position III schwächer koordiniert wird.

3.2.2 Epa1A und Epa3A vermitteln trotz geringer struktureller Verwandtschaft gleiche Spezifität

Epa3A und Epa22A binden ebenfalls fast ausschließlich β 1-3-verknüpfte Galactoside, obwohl sie eine völlig unterschiedliche CBL2-Region als Epa1A und Epa7A aufweisen. Zum einen fehlt das Arginin an Position I, welches sonst innerhalb der kompletten Epa-Familie konserviert ist, wodurch die terminale Galactose lediglich durch das Tryptophan in L3 und das Calciumion gebunden wird. Für Epa3A und Epa22A wurde die Bindung des T-Antigens, welches laut CFG-Analysen das bevorzugt gebundene Disaccharid ist, quantitativ mittels Fluoreszenztitration bestimmt (Abbildung 21, Abbildung 51). Die dabei ermittelten Bindungskonstanten liegen ebenfalls im mikromolaren Bereich, sind aber etwa achtmal geringer als die für Epa1A und Epa7A ermittelten, was sich mit der Tatsache decken würde, dass die terminale Galactose schwächer koordiniert wird. Zudem befindet sich an Position II ein Glycin, welches keine Seitenkette aufweist und weder polar noch geladen ist, weshalb keine Interaktion des Glycins zum Ligand beobachtet werden kann. Das Lysin an Position III hingegen könnte mit der endständigen Galactose interagieren und im Falle von gebundenem T-Antigen könnte sogar eine schwache Interaktion zum *N*-acetylierten Rest beobachtet werden (Abbildung 51).

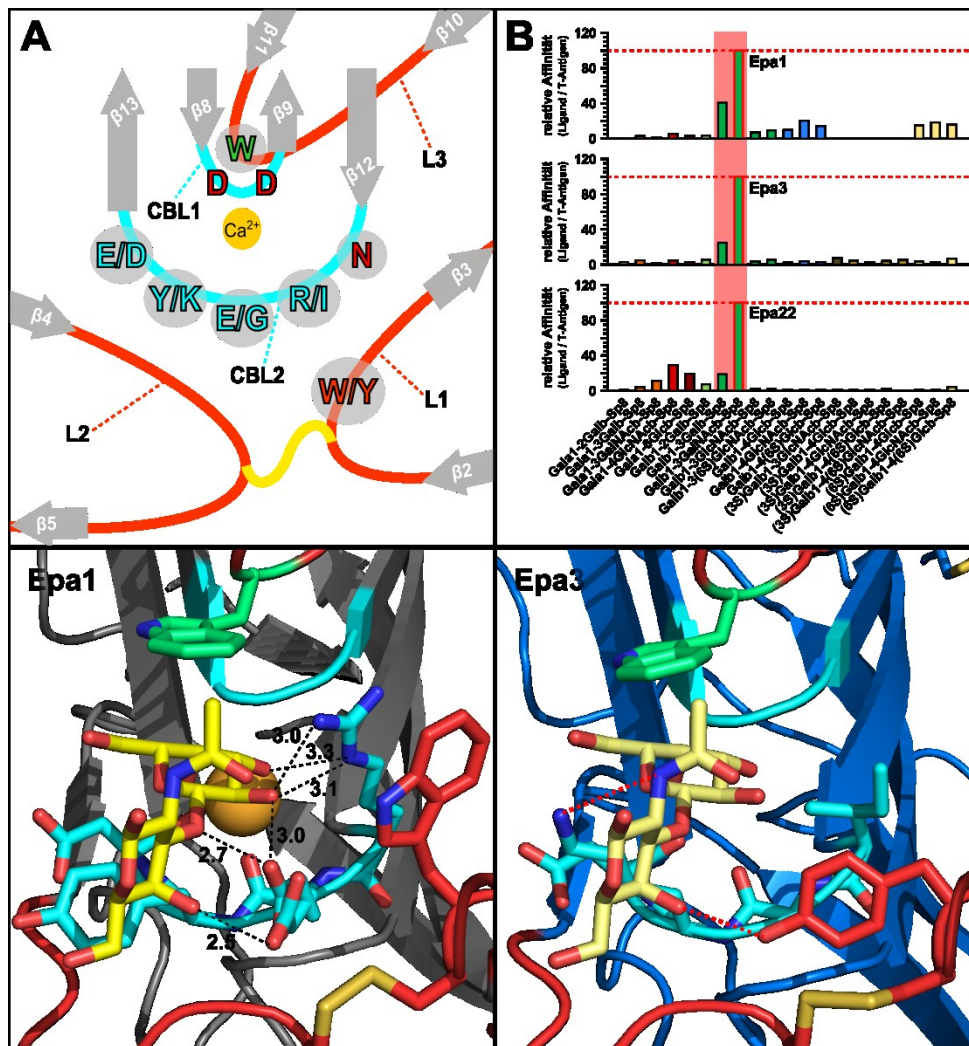


Abbildung 51: Bindungstaschen und Bindungsprofile von Epa1A und Epa3A.

A) Vereinfachte Darstellung der Bindungstasche von Epa1A und Epa3A, die Unterschiede zwischen Epa1 (W) und Epa3 (Y), der CBL2-Region (cyan), sowie die in den Schleifen L1 und L2 sind abgebildet. B) Bindung von Epa1A, Epa3A und Epa22A an Disaccharide die β -Sp8 an den Glykan-Chip gebunden sind. Alle Werte sind auf den Wert des T-Antigens (Gal β 1-3GalNAc) normiert, dem eine relative Affinität von 100 zugeordnet wurde. Die Galactosid-Klassen sind farblich hervorgehoben. Das Signal des T-Antigen ist rot umrandet. Die rot gestrichelte Linie gibt eine relative Affinität von 100 an. Unten links) Bindungstasche von Epa1A mit gebundenem T-Antigen (Gal β 1-3GalNAc). Der Tryptophanrest in L1 (rot) ist ebenfalls in Stab-Darstellung gezeigt. Unten rechts) Modellierter Bindungstasche von Epa3A mit T-Antigen. Das Tyrosin in L1 (rot) ist in Stab-Darstellung gezeigt. Koordinationsmöglichkeiten sind durch gestrichelte Linien (rot) dargestellt. Die Abstände sind in Ångström angegeben.

Hinzu kommt, dass Epa3A und Epa22A kein Tryptophan in L1 aufweisen, welches auf das Cystein, das die Disulfidbrücke zu L2 ausbildet, folgt. Dieses Tryptophan ist bei allen EpaA-Domänen, die ein spezifisches Bindungsspezifitätsprofil zeigen, konserviert und könnte ebenfalls zu einer dichter gepackten Bindungstasche mit größerer Interaktionsfläche führen. Im Fall von Epa3A und Epa22A befindet sich an dieser Position ein Tyrosin. Da sich an Position II der CBL2-Region ein kleines, ungeladenes Glycin ist, wäre an dieser Stelle genügend Raum vorhanden, damit das Tyrosin in die

Bindungstasche hineinreichen könnte um über seine Hydroxylgruppe den gebundenen Ligand zu koordinieren (Abbildung 51). Sowohl das T-Antigen, als auch das nächstbeste gebundene Disaccharid Gal β 1-3Gal, besitzen Galactose als sekundären Glykanrest, sodass eine Stabilisierung der glycosidischen Bindung und der 4-Hydroxylgruppe der sekundären Galactose möglich ist. Eine andere Möglichkeit wäre, dass das Disaccharid leicht gedreht orientiert ist und sich der zweite Glykan in räumlicher Nähe zum kleinen Glycinrest an Position II befindet. Auch hierbei wäre eine zusätzlich Stabilisierung des Liganden durch das Tyrosin der L1 Schleife und das Lysin an Position III denkbar. Um jedoch genauere Aussagen treffen zu können, ist es von hohem Interesse, über eine der beiden A-Domänen mittels Röntgenstrukturanalyse strukturelle Informationen zu erhalten. Zudem könnte somit eventuell die schwache Präferenz von Epa22A, welches neben der CBL2-Region auch in L1 und L2 identisch zu Epa3A ist, zu α -verknüpften Galactosiden erklärt werden (Abbildung 12).

3.2.3 Spezifitätsvermittlung durch Epa9A (Gruppe 1B)

Im Gegensatz zu EpaA-Domänen der Gruppe 1A zeigt Epa9A ein breit gefächertes Spezifitätsprofil und ist sowohl in der Lage α 1-3- und α 1-4- sowie β 1-3- und β 1-4-verknüpfte Galactoside zu binden. An Position I befindet sich ein Arginin, welches wie bei Epa1A mit der terminalen Galactose über die 2- und 3-Hydroxylgruppe interagiert (Abbildung 35). Auch der Austausch der Glutaminsäure zu der um ein C-Atom kürzeren Asparaginsäure an Position II hat keine Auswirkungen auf die Spezifität, da auch die Asparaginsäure sowohl zur Stabilisierung der glycosidischen Bindung, sowie des sekundären Glykanrests befähigt ist. Zudem kann für die Asparaginsäure an Position II eine Interaktion zur Peptidbindung zwischen G150 und C151 der L2 Schleife beobachtet werden. Der in dieser Arbeit verwendete Glycan-Chip MPA V5.1 präsentiert mehrere hochverzweigte Glykane mit terminaler β 1-4-verknüpfter Galactose. Diese Glykane werden in hohem Maße von der Epa9A-Domäne gebunden, welche eine Verlängerung der L1 Schleife aufweist (Abbildung 52). Wahrscheinlich bietet die Verlängerung der L1 Schleife zusätzliche Koordinationsstellen für längere und hochverzweigte Glykane. In dieser Arbeit gelang es zwar, die A-Domäne von Epa9 zu kristallisieren, jedoch ist die Elektronendichte nach der Disulfidbrücke, die L1 und L2 miteinander verknüpft, nicht definiert, sodass keine Aussagen über zusätzliche Koordinationsstellen getroffen werden können

(Abbildung 33). Als zukünftiger Versuch würde sich diesbezüglich die Co-Kristallisation mit höher verzweigten Glykanen anbieten, um die L1-Region eventuell besser zu stabilisieren, wodurch möglicherweise eine definierte Elektronendichte in diesem Bereich erhalten werden könnte.

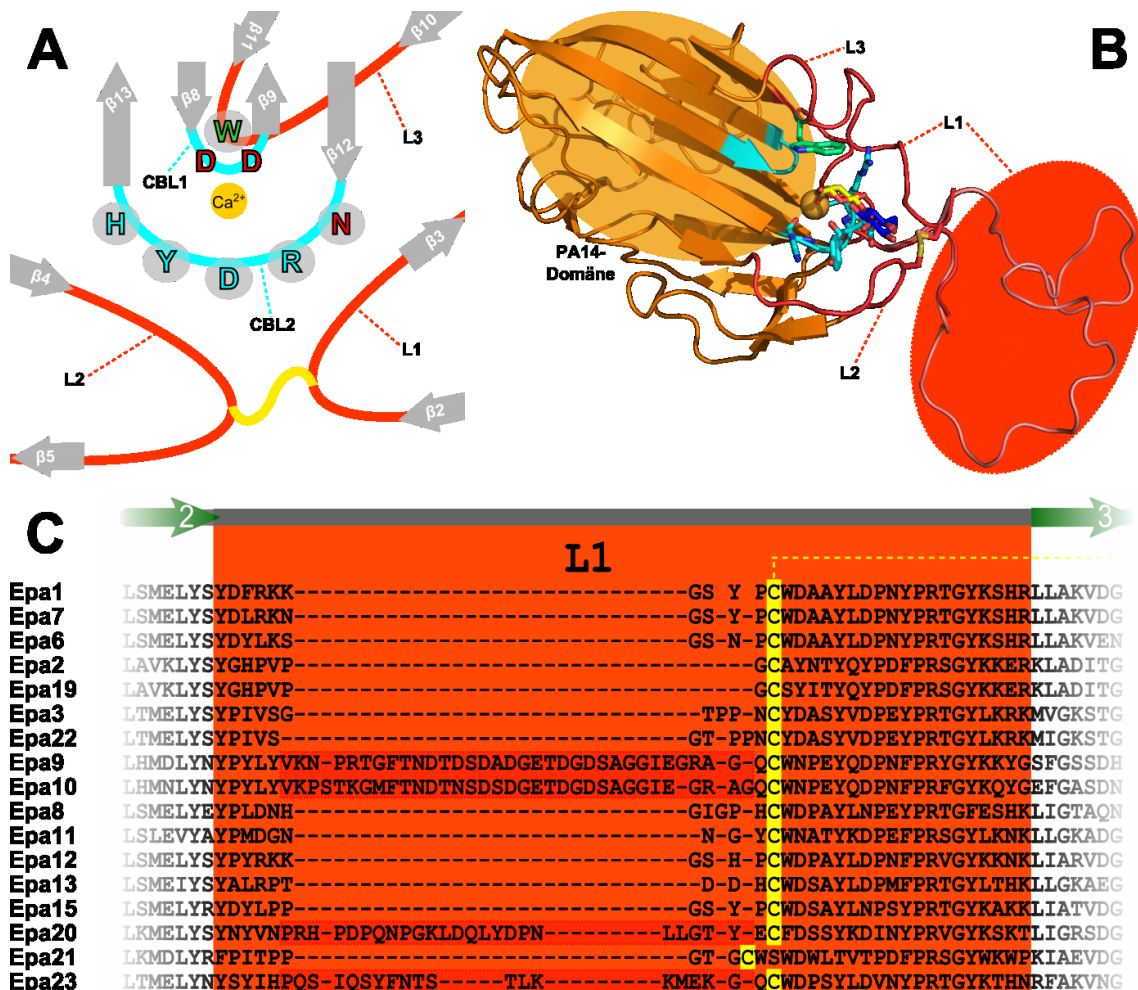


Abbildung 52: Vereinfachte Darstellung der Bindungstasche und atomare Struktur von Epa9A.

A) Vereinfachte Darstellung der Bindungstasche von Epa9A mit der CBL1 und der CBL2-Region (Cyan), den Schleifen L1, L2 und L3 (rot), dem Tryptophan (grün) in L3 sowie der Disulfidbrücke zwischen L1 und L2 (gelb), wie im strukturbasierten Sequenzalignment (Abbildung 12). B) Atomare Struktur von Epa9A mit gebundener Lactose (Galβ1-4Glc) und modellierter L1 Schleife (rot unterlegt). C) Sequenzalignment der L1 Schleifen der EpaA-Domänen. Epa9 und Epa10 zeigen je eine Verlängerung von etwa 30 Aminosäuren. Auch Epa20 und Epa23 weisen eine 20 Aminosäuren umfassende Verlängerung der L1 Region auf.

Welche Verknüpfung von Epa9A bevorzugt wird, ist ebenfalls noch nicht klar. Zwar haben die Ligandenbindungsprofile gezeigt, dass bevorzugt terminale Galactoside mit β1-4-Verknüpfung gebunden werden, es handelt sich hierbei jedoch vor allem um hochverzweigte Glykane (Abbildung 20). Die relative Bindung an Disaccharide mit terminaler α1-3-, α1-4-, β1-3- und β1-4-verknüpfter Galactose sind sich gemäß

CFG-Analysen sehr ähnlich, lediglich das T-Antigen wird etwa dreifach stärker als der Durchschnitt der weiteren Disaccharide gebunden (Abbildung 22). Für eine genauere Beurteilung der Bindungsstärke und der vermittelten Spezifität müssten jedoch Bindungskonstanten ermittelt werden. Die diesbezüglich in dieser Arbeit durchgeführten Versuche waren bis zum jetzigen Zeitpunkt ohne Erfolg. So wurden bei ITC-Messungen sehr in die Breite gezogene Wärmepeaks beobachtet, sodass keine Grundlinie und demnach auch keine Integration der Wärmepeaks möglich war, was sich eventuell auf die langsame Koordinierung des Liganden durch die verlängerte L1 Schleife zurückführen lässt. Ebenfalls wurden Fluoreszenztitrations durchgeföhrt, jedoch war das Emissionsmaximum für Epa9A im Vergleich zu den anderen untersuchten A-Domänen deutlich in den kurzwelligen Bereich verschoben und von einem weiteren Peak überlagert, der ebenfalls bei den anderen A-Domänen beobachtet wurde, jedoch keine Auswirkung auf die Messungen hatte. Die Verschiebung des Emissionsmaximums in den kurzwelligen Bereich könnte sich durch Übertragung der Stoßenergie auf die beiden aromatischen Aminosäuren (Tyrosin an Position III und Histidin an Position IV) innerhalb der Bindungstasche erklären lassen, oder durch Übertragung auf Aminosäurereste der verlängerten L1 Schleife. Des Weiteren wurden noch MST-Messungen unternommen, wobei ein leicht sigmoidaler Verlauf beobachtet werden konnte, jedoch ist bei dieser Methode immer zu bedenken, dass aufgrund der verschiedenen Ligandkonzentrationen Viskositätseffekte die Messung beeinflussen können. Trotzdem bietet diese Methode bei einer guten Systemetablierung die besten Erfolgchancen zur Bestimmung von Bindungsstärken die durch Epa9A vermittelt werden.

3.2.4 Spezifitätsvermittlung durch Epa6A, Epa13A (Gruppe 1C) und Epa11A (Gruppe 2A)

Epa6A und Epa13A wurden aufgrund der hierarchischen Clusteranalyse in die Gruppe 1C eingeteilt. Innerhalb dieser Arbeit gelang es, Epa6A-Strukturen mit gebundener Lactose, T-Antigen, Lacto-*N*-biose, *N*-Acetyl-D-lactosamin und α 1-3 Galactobiose zu messen (Abbildung 34). Zudem konnten die zugehörigen Bindungsstärken mittels Fluoreszenztitration bestimmt werden (Abbildung 30). Anhand der CFG-Analysen zeigt sich, dass Epa6A bevorzugt α -verknüpfte Galactoside bindet, aber auch in der Lage ist β 1-3-verknüpfte Galactoside zu binden. Diese Beobachtung konnte durch Ermittlung von Bindungskonstanten zu den eben erwähnten Disacchariden

unterstützt werden. Hierbei wurde α 1-3 Galactobiose mit einem K_D -Wert von etwa 4 μ M am besten gebunden, dicht gefolgt vom T-Antigen, zu dem eine Bindungsstärke von 5 μ M ermittelt wurde. Lacto-*N*-biose und *N*-Acetyl-D-lactosamin werden zwar schwächer gebunden, jedoch konnte eine geringere Diskriminierung der Bindungsstärken ermittelt werden. Bei Betrachtung der Strukturen interagieren das Arginin an Position I und die Asparaginsäure an Position II mit dem Glykanligand und dem Peptidrückgrad der L2 Schleife, wie bereits für Epa9A beschrieben wurde. Bei der weiteren Betrachtung der Bindungstasche fällt auf, dass an Position III mit einem Asparagin und an Position IV mit einer Asparaginsäure räumlich wenig beanspruchende Aminosäuren lokalisiert sind (Abbildung 53).

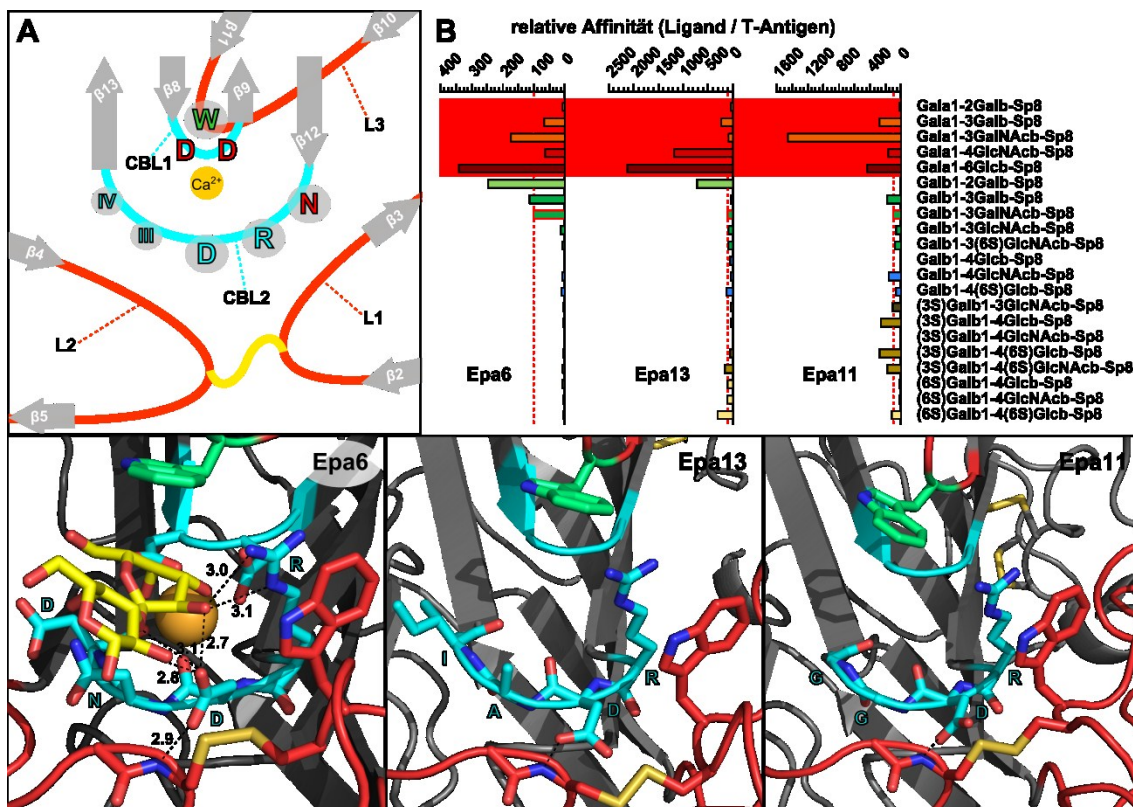


Abbildung 53: Bindungstaschen und Bindungsprofile von Epa6A, Epa13A und Epa11A.

A) Vereinfachte Darstellung der Bindungstasche von EpaA-Domänen der zweiten Untergruppe und Epa11A. Position I und Position II sind konserviert, an Position III und IV der CBL2-Region (cyan) sind sterisch wenig beanspruchende Aminosäuren lokalisiert. B) Bindung von Epa6A, Epa13A und Epa11A an Disaccharide, die β -Sp8 an den Gykan-Chip gebunden sind. Alle Werte sind auf den Wert des T-Antigen (Gal β 1-3GalNAc) normiert, dem eine relative Affinität von 100 zugeordnet wurde. Die Galactosid-Klassen sind farblich hervorgehoben, zudem sind α -verknüpfte Galactoside farblich unterlegt. Das Signal des T-Antigen ist rot umrandet. Die rot gestrichelte Linie gibt eine relative Affinität von 100 an. Unten) Bindungstasche von Epa6A (links), modellierte Bindungstaschen von Epa13A (mitte) und Epa11A (rechts). Aminosäuren der CBL2-Region (cyan) und die Tryptophanreste in L1 (rot) und L3 (grün) sind in Stab-Darstellung gezeigt. Die Abstände sind in Ångström angegeben.

Die Bindungstasche ist demnach verhältnismäßig groß, was die geringere Diskriminierung zwischen den einzelnen Disacchariden erklären könnte (Abbildung 30). Zudem konnten anhand atomarer Strukturen von Epa6A mit verschiedenen Liganden keine bevorzugte Orientierung des sekundären Glykans beobachtet werden, sodass wahrscheinlich verschiedene Konformationen des Liganden innerhalb der Bindungstasche möglich sind, was bereits für die Struktur einer Austauschvariante mit identischer CBL2-Region beobachtet werden konnte (Abbildung 34) (Maestre-Reyna, *et al.*, 2012). Die leichte Präferenz zu α -Verknüpfungen lässt sich im Fall von α 1-3-Galactobiose als Ligand durch Interaktion der 4-Hydroxylgruppe mit dem Asparagin an Position III erklären (Abbildung 34). Noch besser werden α 1-4-verknüpfte Galactoside von Epa6A gebunden, hierzu ist aber kein passender Ligand kommerziell erhältlich, sodass über die vermittelte Bindungsstärke nur spekuliert werden könnte. Epa13A bindet spezifisch α 1-4-verknüpfte Galactoside. An Position I und II befinden sich, wie bei Epa6A, ein Argininrest gefolgt von einer Asparaginsäure. An Position III und IV sind mit einem Alanin und einem Isoleucin ebenfalls zwei räumlich wenig beanspruchende Aminosäuren lokalisiert (Abbildung 53). Ein ähnliches Bild zeigt sich für Epa11A, welches der Gruppe 2 zugeordnet wurde, wobei auch hier bereits zuvor eine Abgrenzung von Epa11A zu den anderen Mitgliedern beobachtet werden konnte. So zeigt das Bindungsspezifitätsprofil von Epa11A niedrige Fluoreszenzintensitäten der Signalpeaks, was anhand der 20 % Grenze der Ligandenbindungsprofile von Abbildung 20 zu beobachten ist, und das Profil vergleichbar mit den Profilen der anderen Mitglieder der Gruppe 2 ist. Bei Betrachtung der 50 % Grenze hingegen ist eine bevorzugte Bindung von α 1-4-verknüpften Galactosiden erkennbar. Dies würde auch die Sonderstellung von Epa11A bei der hierarchischen Clusteranalyse erklären. Auch Epa11A weist an Position I und II ein Arginin und eine Asparaginsäure auf. Zudem ermöglichen die Reste an Position III und IV mit zwei Glycinen Platz innerhalb der Bindungstasche, was auch für Epa6A und Epa13A beobachtet werden konnte. Jedoch lassen sich weder bei Epa11A noch bei Epa13A polare Reste ausmachen, anhand derer sich die Bevorzugung von α -Verknüpfungen im Vergleich zu terminalen β -verknüpften Galactosiden erklären könnte. Zusammenfassend lässt sich die leichte Präferenz der Gruppen 1C und 2A zu terminalen α -verknüpften Galactosiden dadurch erklären, dass an Position II eine um ein C-Atom kürzere Asparaginsäure im Vergleich zur

Glutaminsäure von Epa1A lokalisiert ist. Aufgrund der geringeren sterischen Hinderung an Position II können α -verknüpften Galactosiden gebunden werden, hinzu kommt die stärkere Koordination der glycosidischen Bindung durch die Asparaginsäure. Auch Epa9A, Epa12A und Epa10A tragen ein Asparaginsäure an Position II und vermitteln Bindung an terminale α -verknüpfte Galactoside, da bei diesen EpaA-Domänen an Position III und IV jedoch räumlich beanspruchende Aminosäuren lokalisiert sind, ist die Präferenz zu α -Verknüpfungen geringer als für Epa6A, Epa13A und Epa11A.

3.2.5 Spezifitätsvermittlung durch Epa12A, Epa15A, Epa23A und Epa10A (Gruppe 1D)

Die Gruppe 1D wird durch Epa12A, Epa15A, Epa23A und Epa10A gebildet (Abbildung 18, Tabelle 4). Auch diese EpaA-Domänen binden terminale Galactoside und kennzeichnen sich zusätzlich durch die hohe Präferenz zu endständiger Galactose, die am sechsten C-Atom sulfatiert ist. Alle vier Mitglieder weisen ebenfalls an Position I und II ein Arginin und eine Glutaminsäure auf, wodurch der terminale Galactoserest koordiniert wird. An Position III tragen Epa12A, Epa15A und Epa10A ein Tyrosin. Es wäre denkbar, dass die Sulfatgruppe am sechsten Kohlenstoffatom mit der Hydroxylgruppe des Tyrosins interagiert. Auch Epa1A und Epa9A, die ebenfalls ein Tyrosin an Position III tragen, binden Galactose, die am sechsten C-Atom sulfatiert ist. Epa23A trägt durch das Phenylalanin an Position III zwar eine sterisch vergleichbar beanspruchende Aminosäure, jedoch fehlt die Hydroxylgruppe zur Interaktion mit der Sulfatgruppe. Dafür weist Epa23A aber mit dem Lysin an Position IV eine positiv geladene Aminosäure auf, welche die Präferenz zur elektronenreichen Sulfatgruppe am sechsten C-Atom der terminalen Galactose erklären könnte. Bemerkenswerterweise tragen alle EpaA-Domänen, die zur Bindung sulfatierter Galactoside befähigt sind, entweder ein Tyrosin an Position III oder eine basische Aminosäure an Position IV (Abbildung 54). Epa12A bindet zudem in hohem Maße α -verknüpfte Galactoside. Mit den beiden Tyrosinen an Position III und IV befinden sich hier zwei räumlich anspruchsvolle Aminosäuren innerhalb der Bindungstasche, was im Gegensatz zu den Aminosäuren an Position III und IV der anderen EpaA-Domänen, die terminale α -verknüpfte Galactoside binden, steht. Vielleicht weisen die α -verknüpften Galactoside noch eine andere nicht beobachtete Konformation innerhalb der Bindungstasche auf, welche durch ein Tyrosin an Position III stabilisiert wird. Denn auch Epa9A, Epa10A können α -Verknüpfungen binden. Epa1A (REYD), Epa7A (REYD) und Epa15A

(RDYI) zeigen eine vergleichbare Anordnung der Aminosäuren, jedoch fehlt ihnen an Position IV ein raumbeanspruchender Aromat, wie bei Epa9A (RDYH), Epa10A (RDYH) und Epa12A (RDYY).

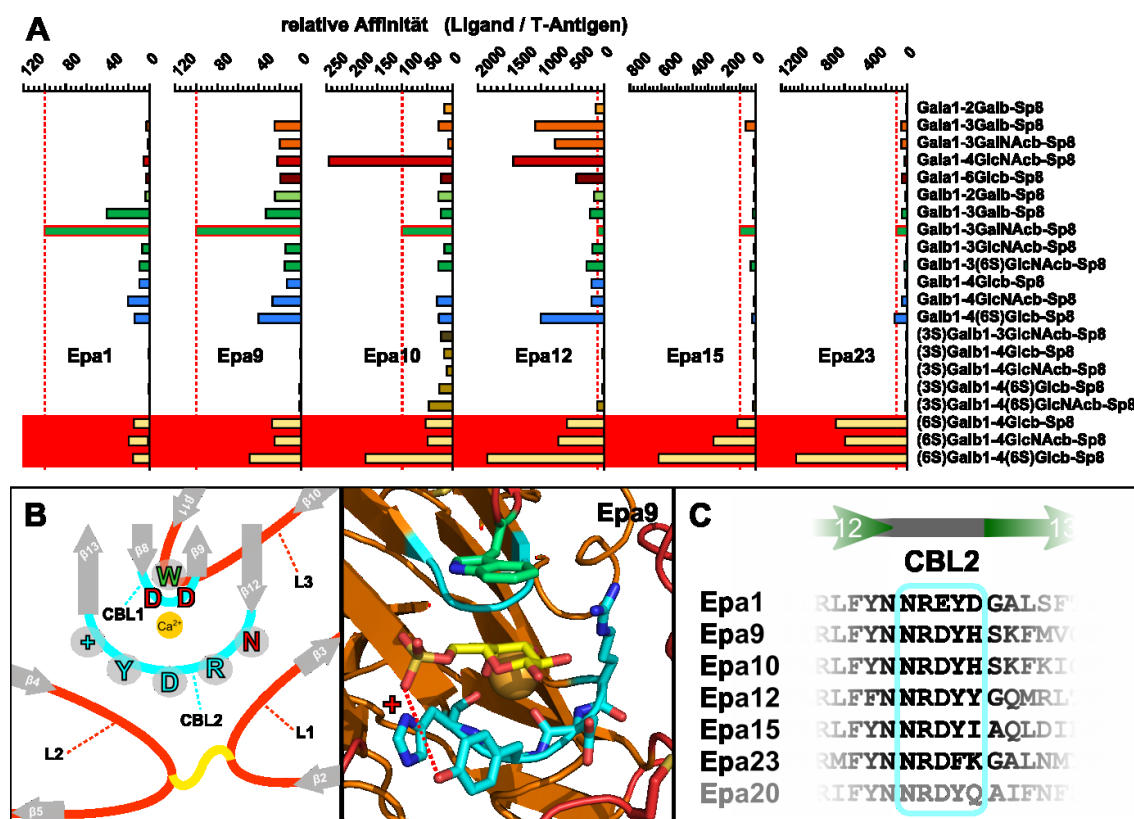


Abbildung 54: Bindungsprofile und Bindungstasche von EpaA-Domänen, die sulfatierte Galactoside binden.

A) Bindung von Epa1A, Epa9A, Epa10A, Epa12A, Epa15A und Epa23A an Disaccharide, die β -Sp8 an den Glykan-Chip gebunden sind. Alle Werte sind auf den Wert des T-Antigens (Gal β 1-3GalNAc) normiert, dem eine relative Affinität von 100 zugeordnet wurde. Die Galactosid-Klassen sind farblich hervorgehoben, zudem sind terminale Galactoside, die am sechsten C-Atom sulfatiert sind farblich unterlegt. Das Signal des T-Antigens ist rot umrandet. Die rot gestrichelte Linie gibt eine relative Affinität von 100 an. B) Bindungstasche von Epa9A mit Sulfogalactose. Aminosäuren der CBL2-Region (cyan) und der Tryptophanrest in L3 (grün) sind in Stab-Darstellung gezeigt, mögliche Interaktionen sind durch gestrichelte Linien hervorgehoben (rot). C) CBL2-Region von EpaA-Domänen, die sulfatierte Galctoside binden.

Es wäre zukünftig also sehr interessant Co-Kristallisationen mit Sulfogalactosiden und weiteren α -verknüpften Galactosiden durchzuführen, um die Richtigkeit der Vermutungen zu überprüfen und Hinweise bezüglich anderer Konformationen α -verknüpfter Galactoside zu erhalten. Auch die Bestimmung weiterer Bindungskonstanten wäre von hohem Interesse. Zwar stimmen die Ergebnisse der Fluoreszenztitration, im Fall von A-Domänen für die mehrere Disaccharide vermessen wurden, relativ gut mit denen der CFG-Analysen überein (Abbildung 21, Abbildung 23, Abbildung 30). Da für Epa12A und Epa23A Bindungsaffinitäten zum T-Antigen

gemessen wurden, die für Epa12 bei 34 μM und für Epa23 bei 4 μM liegen, stellt sich die Frage ob die Bindungsstärke von Epa23A an sulfatierten Galactosiden sogar bis in den nanomolaren Bereich reicht.

3.2.6 Spezifitätsvermittlung durch Epa2A, Epa8A, Epa19A, Epa20A und Epa21A (Gruppe 2B)

Bei Betrachtung der Gruppe 2B, zu der Epa2A, Epa8A, Epa19A, Epa20A und Epa21A zählen, ließ sich keine Spezifität zu einer Glykan-Klasse ausmachen, sodass die Affinität entweder zu gering ist um eindeutige Spezifitätssignale zu messen, oder diese EpaA-Domänen gar keine Bindung vermitteln. Es ist jedoch zu bedenken, dass alle Mitglieder der Gruppe 2B nur in sehr geringen Mengen an löslichem und reinem Protein gewonnen werden konnten, sodass auch keine Bindungsaffinitäten ermittelt wurden. Es bleibt also die Frage offen, aus welchem Grund die Proteine keine spezifische Bindung vermitteln, beziehungsweise ob sie überhaupt zur Bindung befähigt sind. Da diese Proteine in großen Mengen produziert wurden, welche jedoch größtenteils unlöslich waren, sollte in zukünftigen Arbeiten zunächst untersucht werden, ob die Proteine als *Inclusion Bodies* vorliegen, um im Anschluss nach einem geeigneten Denaturierungs- und Rückfaltungsprotokoll zu suchen. Das unlösliche Konstrukt, das gewählt wurde, kann ausgeschlossen werden, da je Protein vier verschiedene Konstrukte bezüglich Expression und Löslichkeit untersucht wurden. Überträgt man jedoch die Informationen, die anhand von EpaA-Domänen der Gruppe 1A, 1B, 1C, 1D und 2B gewonnen wurden auf die EpaA-Domänen der Gruppe 2B, zeigen alle ein Arginin an Position I, welches bei den EpaA-Domänen der Gruppe 1 an der Stabilisierung der terminalen Galactose beteiligt ist. An Position II ist bei allen A-Domänen, mit Ausnahme von Epa21A, eine Asparaginsäure lokalisiert, welche sowohl mit der auf das Cystein in L2 folgenden Peptidbindung, sowie einer terminal gebundenen Galactose interagieren könnte. Epa2A (RDNN) und Epa19A (RDNN) könnten eine ähnliche Spezifität wie Epa6A (RDND) vermitteln, da sich ihre Bindungstasche, bezogen auf die CBL2-Region, lediglich durch den Austausch der Asparaginsäure an Position IV in ein Asparagin unterscheidet. Für Epa8A konnten kleine Signalpeaks für Gal α 1-3Gal, Gal β 1-3GalNAc und (S)Gal β 1-4(S)Glc gemessen werden (Abbildung 55). Epa8A (RDGR) hat gewisse Ähnlichkeiten zu den A-Domänen von Epa3 und Epa22 (IGKD), da auf einen Glycinrest eine langgestreckte basische Aminosäure folgt, wodurch sich die Bindung zum T-Antigen erklären könnte. Anhand

des positiv geladenen Arginins ließe sich aber auch der Signalpeak bei sulfatierter Galactose erklären. Der stärkste Peak wurde jedoch bei α 1-3 Galactobiose gemessen, vielleicht ist durch das Glycin an Position III genügend Platz für α -verknüpfte Galactoside vorhanden.

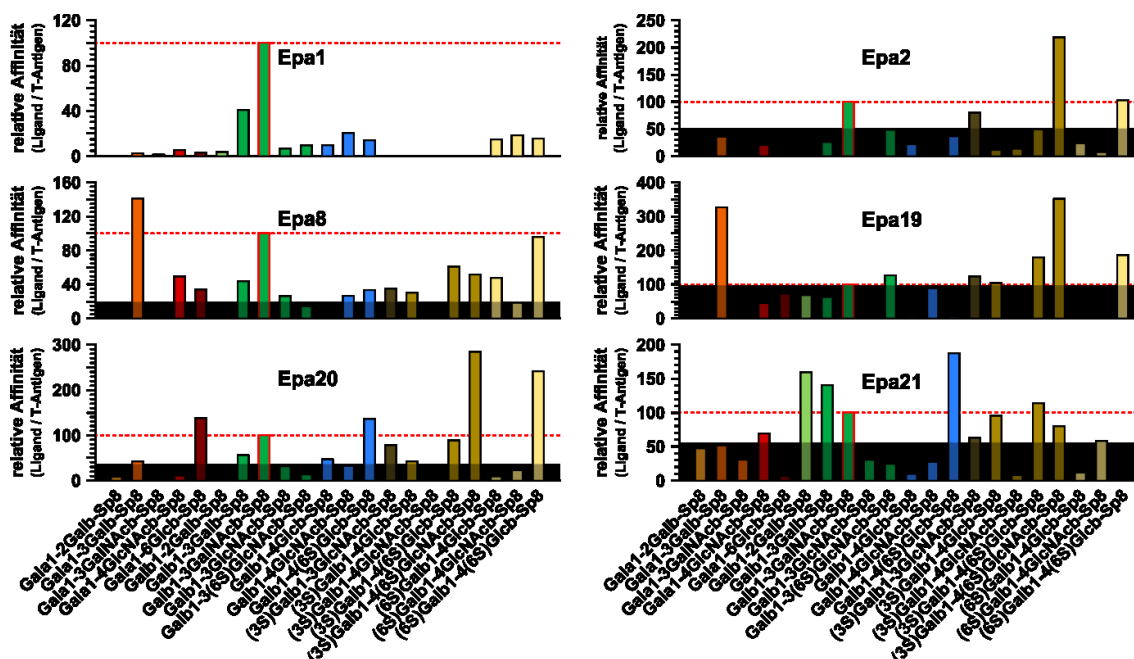


Abbildung 55: Bindungsprofile von EpaA-Domänen der Gruppe 2 und Epa1A.

Bindung von Epa1A, Epa2A, Epa8A, Epa19A, Epa20A und Epa21A an Disaccharide die β -Sp8 an den Glykan-Chip gebunden sind. Alle Werte sind auf den Wert des T-Antigens (Gal β 1-3GalNAc) normiert, dem eine relative Affinität von 100 zugeordnet wurde. Die Galactosid-Klassen sind farblich hervorgehoben. Die durchschnittliche relative Affinität zu Disacchariden, die β -Sp8 an den Glykan-Chip gebunden sind, jedoch keinen terminalen Galactoserest aufweisen, wird durch die farbliche Unterlegung hervorgehoben (grau). Das Signal des T-Antigens ist rot umrandet. Die rot gestrichelte Linie gibt eine relative Affinität von 100 an.

Epa20A (RDYQ) zeigt voraussichtlich eine ähnliche Bindungstasche wie Epa1A und Epa7A (REYD) und könnte demnach eine spezifische Bindung zu β 1-3-verknüpften Galactosiden vermitteln. Zudem konnte eine Verlängerung der L1 Schleife beobachtet werden, sodass eventuell längere und verzweigte Galactoside von Epa20A gebunden werden könnten (Abbildung 52). Epa21A besitzt mit zwei polaren Cysteinen an Position II und III, sowie dem räumlich wenig beanspruchendem Glycin an Position IV, eine vorher noch nicht bekannte Bindungstasche, die ein ganz anderes Spezifitätsprofil zeigen könnte, vorausgesetzt, dass diese A-Domänen überhaupt Bindung vermittelt. Terminale Galactoside, die am dritten C-Atom sulfatiert sind, werden voraussichtlich von keiner der EpaA-Domänen gebunden, da innerhalb der Bindungstasche kein Platz für eine solche Sulfatierung ist.

3.3 Die CBL2-Region ist nur teilweise an der Vermittlung der Spezifität beteiligt

In der vorliegenden Arbeit wurden zehn CBL2-Austauschvarianten untersucht, um den Beitrag der CBL2-Region zur Bindungs- und Spezifitätsvermittlung beurteilen zu können. Durch den Vergleich der erhaltenen Daten mit den Ergebnissen, die für die unveränderten EpaA-Domänen gewonnen wurden, kann der Einfluss der CBL2-Region auf die Ligandenbindungsspezifität beurteilt werden. Dies wurde bereits in Abschnitt 2.8 für alle zehn CBL2-Austauschvarianten anhand der Ergebnisse diskutiert, die mittels funktioneller *in vivo* Analysen erhalten wurden. Des Weiteren wurden CFG-Profile ausgewählter CBL2-Austauschvarianten erstellt (Epa1A^{CBL2Epa9}, Epa9A^{CBL2Epa1}, Epa3A^{CBL2Epa1} und Epa3A^{CBL2Epa2}), welche anschließend mit den Bindungsspezifitätsprofilen der unveränderten EpaA-Domänen verglichen wurde (Abschnitt 2.9). Um den Einfluss der CBL2-Region auf die Ligandenbindungsspezifität genauer zu untersuchen, sollen nun die Bindungsspezifitätsprofile der bereits zuvor untersuchten CBL2-Austauschvarianten Epa1A^{CBL2Epa2}, Epa1A^{CBL2Epa3} und Epa1A^{CBL2Epa6} mit den Bindungsspezifitätsprofilen der unveränderten EpaA-Domänen verglichen werden (Maestre-Reyna, *et al.*, 2012). Dazu wurden erneut Ligandenbindungsprofile wie in Abschnitt 2.3.3 erstellt. Da bei den früheren Untersuchungen eine ältere Version des Glykan-Chips (MPA V4.1) mit 465 putativen Glykanliganden verwendet wurde, mussten die gemessenen Daten jedoch zunächst auf die gleichen Glykane reduziert werden, sodass die Ergebnisse direkt miteinander vergleichbar sind. Nachfolgend sind die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse (obere Reihe) zusammen mit den von Manuel Maestre-Reyna ermittelten Daten (untere Reihe) dargestellt (Abbildung 56). Die beiden Versionen des Glykan-Chips unterscheiden sich bei genauerer Betrachtung hauptsächlich dadurch, dass die neuere Version (MPA 5.1) um hochverzweigte Glykane mit terminaler β 1-4-verknüpfter Galactose, sowie Glykane ohne terminalen Galactoserest erweitert ist. Dadurch erklärt sich die im Vergleich zu Abbildung 20 verminderte Bindung von Epa9A zu β 1-4-verknüpften Galactosiden (Abbildung 56). Des Weiteren zeigen sich Unterschiede beim Vergleich der Ligandenbindungsprofile der in dieser Arbeit untersuchten Epa1A-Domäne zu den Profilen, die in der Arbeit von Manuel Maestre-Reyna ermittelt wurden. Die früher gemessenen Ligandenspezifitätsprofile zeigen, dass Epa1A bevorzugt terminale

β 1-4-verknüpfte Galactoside und zusätzlich sulfatierte Galactoside bindet. Dieses Beobachtung entspricht jedoch nur teilweise der Realität, denn auch bei den früheren Messungen wurde festgestellt, dass Epa1A bevorzugt terminale β 1-3-verknüpfte Galactose bindet (Zupancic, *et al.*, 2008, Maestre-Reyna, *et al.*, 2012).

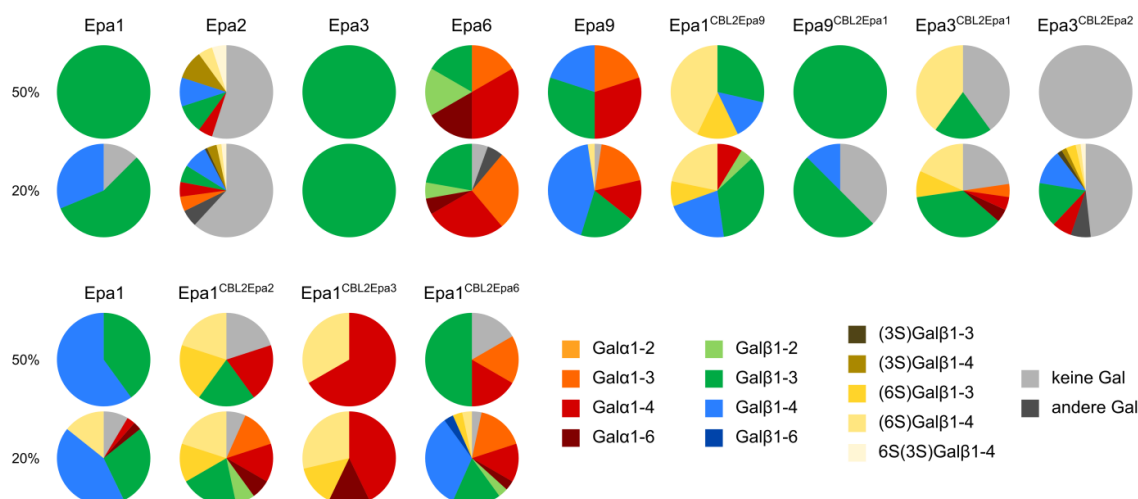


Abbildung 56: Ligandenbindungsprofile von Varianten der EpaA-Domänen zu terminalen Galactosiden.

Die Tortendiagramme repräsentieren die Bindung zu verschiedenen terminalen Galactosid-Typen, die eine relative Fluoreszenzintensität von $\geq 20\%$ oder $\geq 50\%$ der Fluoreszenzintensität des bestgebundenen Liganden aufweisen (Tabelle 49 und Tabelle 50). Es wurden die Glykan Chips MPA V4.1 und MPA V 5.1 verwendet. Die erhaltenen Daten wurden anschließend auf die gleichen Glykane reduziert. Es wurden ausschließlich verzweigte Glykan-Liganden berücksichtigt, die eindeutig einer Gruppe von terminalen Galactosiden und der darauffolgenden Verknüpfung zugeordnet werden konnten. Der Farbcode für die unterschiedlichen Galactosid-Typen ist unterhalb der Tortendiagramme abgebildet.

Die beobachtete Verschiebung des Ligandenspezifitätsprofils lässt sich dadurch erklären, dass der bevorzugt gebundene Ligand, welcher auf einen Wert von 100 normiert wird, im Vergleich zu den weiteren Glykanen schwächer gebunden wird. Dadurch werden nun Glykane berücksichtigt, die vorher knapp unter den 20 % und 50 % Grenzen lagen. Wahrscheinlich wurden leicht variierende Konzentrationen eingesetzt, die diese Verschiebung bewirken, denn bei früheren Messungen mit geringeren Proteinkonzentrationen von bis zu 1 $\mu\text{g/ml}$ wurden ausschließlich β 1-3-verknüpfte Galactoside durch Epa1A gebunden (Maestre-Reyna, *et al.*, 2012). Bei der nachfolgenden Diskussion der Ergebnisse, werden den Aminosäuren der CBL2-Region ebenfalls die Positionen von I bis IV zugeordnet (Abbildung 49).

3.3.1 Austausch der CBL2-Region von Epa1A durch die CBL2-Region von Epa2A, Epa3A und Epa6A

3.3.2 Austausch der CBL2-Region von Epa1A durch die von Epa2A

Epa1A^{CBL2Epa2} bindet bevorzugt sulfatierte, β 1-3- und α -verknüpfte Galactoside, vermittelt jedoch im Gegensatz zu Epa1A keine Bindung zu β 1-4-verknüpften Galactosiden. Epa2A zeigt hingegen keine Bevorzugung von Disacchariden, die einer Glykan-Klasse zugeordnet werden können (Abbildung 56, Abbildung 57). Epa1A^{CBL2Epa2} trägt an Position II eine geladene Glutaminsäure, an Position III einen aromatischen Tyrosinrest und an Position IV einen neutralen Asparaginrest. Die bevorzugte Bindung sulfatierter Galactoside könnte sich durch die Verringerung der negativen Ladung an Position IV erklären. Zudem ist die Bindungstasche ohne das Tyrosin an Position III zugänglicher, sodass bevorzugt α -verknüpfte Galactoside gebunden werden. Des Weiteren vermittelt Epa1A^{CBL2Epa}, im Vergleich zum *S. cerevisiae* Stamm, der Epa1A auf seiner Oberfläche präsentiert, eine leicht verminderte Adhäsion von Hefezellen an Epithelzellen (Abbildung 40). Auch die Adhäsion an Agar ist leicht abgeschwächt im Vergleich zu Epa1A, wohingegen Epa2A weder Adhäsion an Caco-2 Zellen noch an Agar vermittelt (Abbildung 36). Der Austausch von drei Aminosäuren der CBL2-Region führt also im Fall von Epa1A^{CBL2Epa2} zu einer deutlichen Spezifitätsverschiebung und auch zu einer Verminderung der Bindungsstärke, es erfolgt jedoch kein Spezifitätswechsel.

3.3.3 Austausch der CBL2-Region von Epa1A durch die von Epa3A

Epa1A^{CBL2Epa3} vermittelt ebenfalls Bindung an α -verknüpfte und sulfatierte Galactoside, wohingegen sowohl Epa1A als auch Epa3A bevorzugt β 1-3 verknüpfte Galactoside binden. Die von Epa1A^{CBL2Epa3} vermittelte Bindung sulfatierter Galactoside lässt sich durch das basische Lysin an Position III erklären (Abbildung 56, Abbildung 57). Des Weiteren bewirkt der Austausch des Arginins an Position I gegen das neutrale Isoleucin, wahrscheinlich eine geringere Bindungsstärke, da die terminale Galactose nicht durch das Isoleucin koordiniert werden kann. Für die A-Domäne von Epa3 wurde postuliert, dass der terminale Galactoserest durch das Tyrosin in L1 stabilisiert wird (Abbildung 51). Epa1A^{CBL2Epa3} fehlt jedoch dieser Tyrosinrest in L1, was erklären könnte, dass kein Ligand in der Kristallstruktur von Epa1A^{CBL2Epa3} gefunden wurde und

nur sehr geringe Bindungsstärken ($30 \mu\text{M}$) von Epa1A^{CBL2Epa3} an das T-Antigen ermittelt wurden (Abbildung 48) (Maestre-Reyna, *et al.*, 2012).

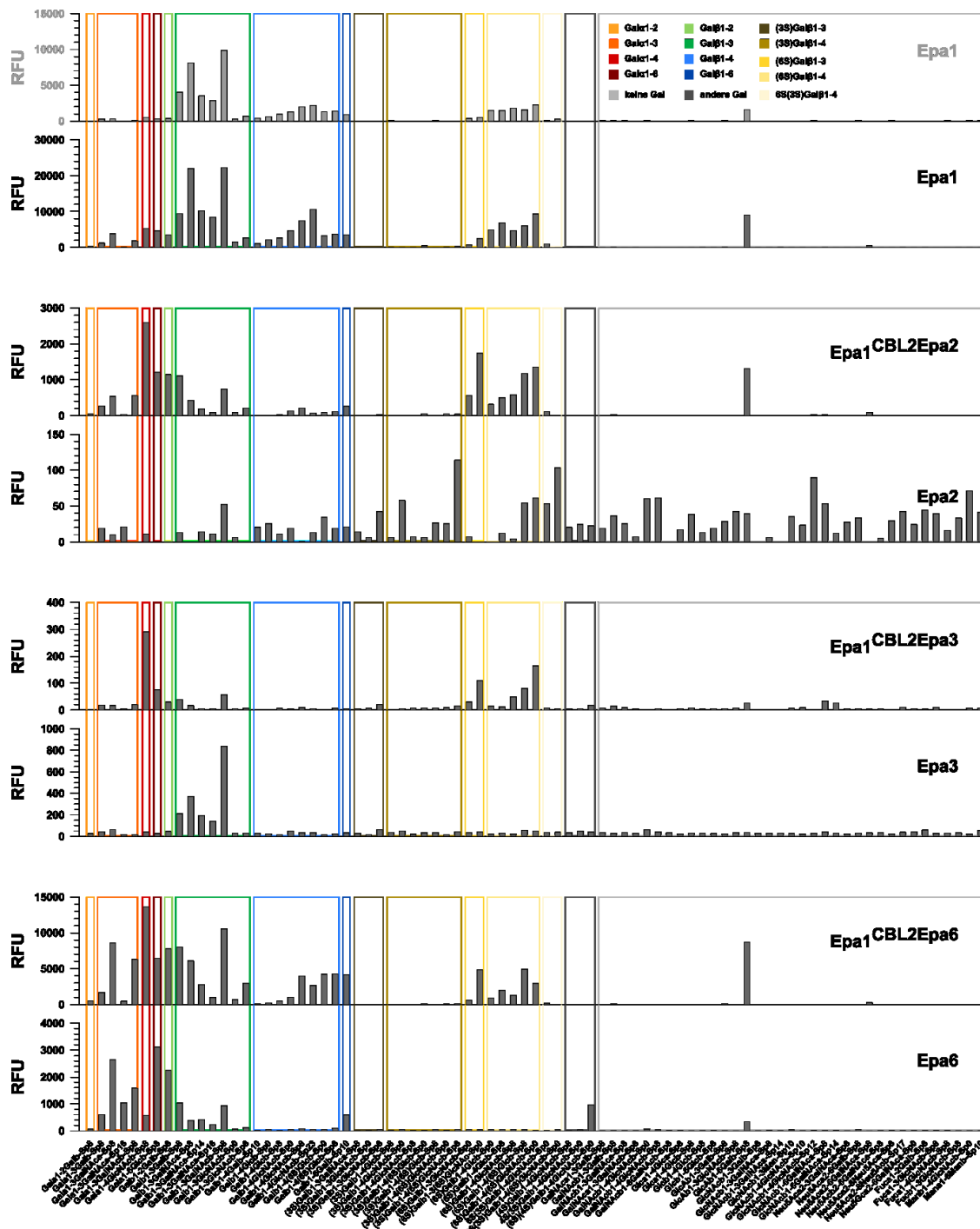


Abbildung 57: Bindung von Disacchariden durch die Epa1A-Varianten im Vergleich zu den zugehörigen unveränderten EpaA-Domänen.

Bindung verschiedener EpaA-Domänen an alle Disaccharide (unten), die auf den Glykan-Chips MPA V4.1 und MPA V5.1 präsentiert werden. Die verschiedenen Galactosid-Typen sind durch unterschiedlich farbige Boxen hervorgehoben. Die Bindungsaffinität zu den einzelnen Disacchariden spiegelt sich in der Höhe der relativen Fluoreszenz wieder. Die Werte entsprechen den Fluoreszenzintensitäten der CFG-Profile, die bei einer Proteinkonzentration von $200 \mu\text{g/ml}$ erhalten wurden.

Die verminderte Bindungsstärke zeigt sich zudem bei den Adhäsionsanalysen mit Hefezellen, die Epa1A^{CBL2Epa3} an ihrer Oberfläche präsentieren. Dabei vermittelt Epa1A^{CBL2Epa3} weder Adhäsion an Caco-2 Zellen noch adhäsives Wachstum an Agar, was vergleichbar zur Adhäsion von Hefezellen ist, die keine A-Domäne an ihrer Oberfläche präsentieren. Auch im Fall von Epa1A^{CBL2Epa3} kann durch den Austausch der CBL2-Region kein Spezifitätswechsel beobachtet werden.

3.3.4 Austausch der CBL2-Region von Epa1A durch die von Epa6A

Die A-Domäne Epa1A^{CBL2Epa6}, die sich von Epa1A^{CBL2Epa2} nur über die negativ geladene Asparaginsäure an Position IV unterscheidet, weist im Vergleich zur Epa1A-Domäne ebenfalls eine größere Bindungstasche auf, sodass von Epa1A^{CBL2Epa6} sowohl α - und β -Verlinkungen gebunden werden (Abbildung 56, Abbildung 57). Aufgrund der negativen Ladung an Position IV lässt sich voraussichtlich, im Gegensatz zu Epa1A^{CBL2Epa2}, keine Bindung an sulfatierte Galactosiden messen. Epa1A^{CBL2Epa6} zeigt durch den Austausch der CBL2-Region einen Spezifitätswechsel, jedoch werden weiterhin terminale β 1-4-verknüpfte Galactoside gebunden, die nur von Epa1A, aber nicht von Epa6A gebunden werden. Demnach müssten weitere Aminosäurereste in L1 und L2 an der Bindung terminaler β 1-4-verknüpfter Galactoside involviert sein. Ansonsten vermittelte Epa1A^{CBL2Epa6} eine vergleichbar starke Bindung des T-Antigens, was sich ebenfalls in der starken Adhäsion an Agar und Caco-2 Zellen widerspiegelt (Abbildung 40) (Maestre-Reyna, *et al.*, 2012). Auch das adhäsive Wachstum von Hefezellen, die Epa1A und Epa1A^{CBL2Epa6} an ihrer Oberfläche präsentieren, zeigt keinen Unterschied der vermittelten Bindung. Lediglich die relative Affinität von Epa1A^{CBL2Epa6} an Caco-2 Zellen ist geringfügig schwächer.

3.3.5 Austausch der CBL2-Region von Epa1A durch die von Epa9A sowie Austausch der CBL2-Region von Epa9A durch die von Epa1A

Epa1A^{CBL2Epa9} bindet α - und β -verknüpfte sowie sulfatierte Galactoside und zeigt wie Epa9A eine breite Spezifität zu verschiedenen Galactosid-Klassen (Abbildung 42). Es wird jedoch, im Gegensatz zu Epa9A, keine Bindung von Epa1A^{CBL2Epa9} zu langkettigen und hochverzweigten Galactosiden vermittelt. Dies lässt sich voraussichtlich auf die fehlende Verlängerung der L1 Region zurückführen. Das Tyrosin an Position III und das basische Histidin an Position IV tragen zu einer bevorzugten Bindung sulfatierter Galactoside durch Epa1A^{CBL2Epa9} bei. Des Weiteren

konnte beobachtet werden dass die vermittelte Adhäsion an das T-Antigen, Caco-2 Zellen und Agar vergleichbar stark wie die von Epa1A ist (Abbildung 40). Zusammenfassend zeigt Epa1A^{CBL2Epa9} ein chimäres Spezifitätsprofil der beiden A-Domänen von Epa1 und Epa9, sodass die Bindung nur teilweise durch den Austausch der CBL2-Region beeinflusst wird.

Epa9A^{CBL2Epa1} hingegen zeigt ein sehr ähnliches Ligandenbindungsprofil wie Epa1A, sodass ein Spezifitätswechsel postuliert werden kann. Jedoch ist die durch Epa9A^{CBL2Epa1} vermittelte Adhäsion an Caco-2 Zellen und Agar deutlich geringer, als die von Epa1A, dafür aber ähnlich zu der relativen Adhäsion, die durch Epa9A vermittelt wird. Wahrscheinlich führt die Verlängerung der L1 Schleife von Epa9A und Epa9A^{CBL2Epa1} zu einer schwächeren Bindung von Disacchariden zugunsten der Bindung hochverzweigter Galactoside, weshalb die Ligandenbindungsspezifität im Fall von Epa9A^{CBL2Epa1} ebenfalls nur teilweise durch den Austausch der CBL2 Region beeinflusst wird.

3.3.6 Austausch der CBL2-Region von Epa3A durch die von Epa1A und Epa2A

Epa1A und Epa3A binden beide bevorzugt β 1-3-verknüpfte Galactoside. Epa1A vermittelt zudem Bindung an sulfatierte Galactoside, jedoch deutlich schwächer im Vergleich zum bevorzugten Liganden, sodass sich diese Präferenz erst bei der Betrachtung der Bindung an Disacchariden beobachten lässt (Abbildung 57). Epa3A^{CBL2Epa1} vermittelt ebenfalls die Bindung von terminalen β 1-3-verknüpften und sulfatierten Galactosiden. Da Epa3A^{CBL2Epa1} einen Tyrosinrest in L1 anstelle des Tryptophanrest aufweist, könnte die Bindungstasche größer sein, sodass sulfatierte Galactoside eventuell besser durch das Tyrosin an Position III stabilisiert werden und die Abstoßung der negativen Ladung an Position IV geringer ist. Dies würde die bevorzugte Bindung sulfatierter Galactoside durch Epa3A^{CBL2Epa1} erklären (Abbildung 56). Epa3A^{CBL2Epa1} zeigt also eine Spezifitätsverschiebung durch Austausch der CBL2-Region. Das Profil weist aber auch Eigenschaften von Epa1A und Epa3A auf, sodass die vermittelte Bindungsspezifität nur teilweise auf die CBL2-Region zurückzuführen ist.

Für Epa3A^{CBL2Epa2} konnte trotz großer Mengen an löslichem und reinem Protein, keine Bindung von Glykanen des Glykan-Chips gemessen werden, was ebenfalls für Epa2A

beobachtet wurde. Es konnte jedoch adhäsives Wachstum von Hefezellen, die Epa3A^{CBL2Epa2} auf ihrer Oberfläche präsentieren, an Agar beobachtet werden, wohingegen Epa2A keine Adhäsion vermittelt (Abbildung 40). Demnach lässt sich erneut kein vollständiger Wechsel der Ligandenbindungsspezifität durch Austausch der CBL2-Region beobachten.

Zusammenfassend zeigt sich, dass die CBL2-Region entscheidend zur Spezifitätsvermittlung beiträgt und zudem die Bindungsstärke beeinflusst. Jedoch ist der Beitrag der beiden hypervariablen Schleifen L1 und L2 deutlich höher, als zuvor angenommen (Zupancic, *et al.*, 2008, Maestre-Reyna, *et al.*, 2012). Dies konnte bereits anhand der Epa1A^{C78S}-Domäne beobachtet werden, bei der die beiden Schleifen L1 und L2 nicht mehr über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Somit fehlt die Fixierung ihrer Position, was eine erhebliche Verringerung der Adhäsion mit sich bringt (Abbildung 39). L1 und L2 sind aber nicht nur an einer dichteren Packung der Bindungstasche, sowie der Abschirmung dieser vor Solvenseinflüssen, beteiligt. So weisen die CFG-Profile der chimären CBL2-Austauschvarianten Spezifitäten beider A-Domänen auf, was darauf schließen lässt, dass L1 und L2 ebenfalls an der Vermittlung der Ligandenspezifität beteiligt sind. Anhand der *in vivo* Daten kann man sogar davon ausgehen, dass L1 und L2 einen höheren Einfluss auf die Bindungs- und Spezifitätsvermittlung als die CBL2-Region haben (Abbildung 40). Um diese Aussage besser zu beurteilen, müssten aber zukünftig weitere Untersuchungen durchgeführt werden, wobei EpaA-Varianten betrachtet werden könnten bei denen lediglich L1 und L2 ausgetauscht sind.

3.4 Ausblick

3.4.1 *C. glabrata* und der Mensch: Diversifizierung der adhäsiven Eigenschaften als Infektionsstrategie

Anhand genomischer Analysen des in dieser Arbeit verwendeten *C. glabrata* Stamms CBS138 konnte eine große Anzahl von 66 Sequenzen identifiziert werden, die für GPI-verankerte Zellwandadhäsine kodieren (Weig, *et al.*, 2004, de Groot, *et al.*, 2008, Desai, *et al.*, 2011). Basierend auf phylogenetischen Analysen der putativen N-terminalen Ligandenbindungsdomäne dieser Adhäsine, konnten diese anschließend in sieben Unterfamilien eingeteilt werden, von denen die EPA-Familie mit ihren 17

Mitgliedern die GröÙte darstellt (Abbildung 9) (de Groot, *et al.*, 2008). Die genetische Instabilität der repetitiven Sequenzen der B-Domänen, sowie die subtelomere Lokalisation von zwei Dritteln der GPI-verankerten Zellwandadhäsine, hat einen Einfluss auf ihre Regulation durch Chromatin-basiertes Gen-*Silencing* und auf ihre Varianz durch interchromosomale Rekombination (De Las Penas, *et al.*, 2003, Castano, *et al.*, 2005, Iraqui, *et al.*, 2005, Verstrepen, *et al.*, 2005, MacCallum, *et al.*, 2009, Verstrepen & Fink, 2009, Goossens & Willaert, 2010). Demnach wird *C. glabrata* aufgrund der epigenetischen Regulation der Zellwandadhäsine, auch innerhalb einer klonalen Population, ermöglicht verschiedene Zell-Oberflächen-Adhäsine zu präsentieren und sich so optimal an verschiedene Nischen im Wirtsorganismus anzupassen.

Über die am Besten untersuchten Mitglieder der Epa-Familie Epa1, Epa6 und Epa7 ist bekannt, dass sie Adhäsion an menschliche Epithel- und Endothelzellen vermitteln (Cormack, *et al.*, 1999, Domergue, *et al.*, 2005, Zupancic, *et al.*, 2008, Maestre-Reyna, *et al.*, 2012, Zirkel, *et al.*, 2012). Zudem konnte für Epa1 bereits die Adhäsion an menschliche Immunzellen beobachtet werden (Kuhn & Vyas, 2012). Dabei beruht die Adhäsion an menschliche Epithelzellen auf der Bindung verschiedener Glykoproteine, die je nach Gewebstyp unterschiedliche Glykosylierungsmuster aufweisen (Zupancic, *et al.*, 2008, Maestre-Reyna, *et al.*, 2012). Da im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass die verschiedenen EpaA-Domänen unterschiedliche Ligandenspezifitäten vermitteln und ebenfalls bekannt ist, dass *C. glabrata* in Abhängigkeit von seiner Umgebung nur einen Teil der vorhandenen Adäsine exprimiert, lässt vermuten, dass die Kolonisierung verschiedener Gewebstypen auf die Expression einzelner Epa-Proteine zurückzuführen ist (Gipson, *et al.*, 1997, Bartman, *et al.*, 1998, Castano, *et al.*, 2005, Domergue, *et al.*, 2005, Russo, *et al.*, 2006). So lieÙe sich die Kolonisierung der Mundhöhlen oder des Darmepithels, in denen eine Anreicherung von Sulfo-Mucinen beobachtet werden kann, durch Expression von Epa12, Epa15, Epa23 und Epa10 aus der Gruppe 1D erklären lassen, die eine bevorzugte Bindung an sulfatierte Galactoside vermitteln (Nieuw Amerongen, 1998). Die Gruppe 1A, bestehend aus Epa1, Epa7, Epa3 und Epa22 könnte Mucine binden die Core 1 oder Core 2 O-glykosyliert sind, da diese terminale Galβ1-3-Vernüpfungen aufweisen, wohingegen Core 8 O-glykosylierte Mucine durch die Gruppe 1C mit Epa6 und Epa13 gebunden werden könnten (Fukuda, 2002, McEntyre & Freeze, 2009). Einige Core O-Glykosylierungen zeigen jedoch

keinen terminalen Galactosereste und werden demnach voraussichtlich nicht durch die Epa-Familie gebunden. Hierbei ist aber zu bedenken, dass neben den 17 Epa-Proteinen noch 49 weitere Sequenzen identifiziert wurden, die für GPI-verankerte Zellwandadhäsine kodieren und die zur Bindung anderer Glykosylierungsmuster befähigt sein könnten (de Groot, *et al.*, 2008). Hierzu zählt unter anderem die Pwp-Familie mit ihren sieben Mitgliedern, für die ebenfalls vorausgesagt wird, dass ihre funktionelle A-Domäne eine PA14-Domäne enthält. Für Pwp7 konnte zudem bereits mittels *in vitro* Analysen die Adhäsion an menschlichen Endothelzellen nachgewiesen werden (de Groot & Klis, 2008, de Groot, *et al.*, 2008, Desai, *et al.*, 2011). Für die N-terminale Domäne der weiteren 42 putativen Adhäsine in *C. glabrata* konnte hingegen keine Homologie zu den Mitgliedern der Epa- oder Pwp-Familie festgestellt werden, zudem sind bis zum jetzigen Zeitpunkt weder Informationen über mögliche Liganden noch zur Funktion bekannt (de Groot, *et al.*, 2013). Lediglich für Aed1 konnte ebenfalls beobachtet werden, dass es Adhäsion an Endothelzellen vermittelt (Desai, *et al.*, 2011).

Mit Hilfe dieser Arbeit konnte ein Einblick in die Funktion der kompletten Epa-Familie gewonnen werden. Die erhaltenen Ergebnisse tragen zum einen dazu bei besser zu verstehen, auf welche Weise der Pilz den Mensch besiedelt und so unter geeigneten Bedingungen zur Manifestation einer Krankheit führt, zum anderen können die erhaltenen Erkenntnisse dazu beitragen neuartige Antimykotika zu entwickeln, die gezielt die Adhäsion der Pilzzellen unterbinden. Da *C. glabrata* aber über ein breites Repertoire an Adhäsinen verfügt, also neben den Epa-Proteinen noch weitere Proteine an der Ausbildung der Adhäsion beteiligt sind, ist es in Zukunft nötig auch diese detailliert zu untersuchen.

4 Material

4.1 Geräte

Als temperierbarer Inkubationsschüttler wurde der Multitron Pro von *Infors AG* (Bottmingen, CH) verwendet

Für die Proteinaufreinigung wurden Säulenkörper, Säulenmaterial, vorgepackte Säulen, PD10-Säulen, eine P1 Peristaltikpumpe sowie das ÄKTApurifier HPLC-System von *GE Healthcare* (München, D) verwendet.

Es wurden Proteingelapparaturen und Geldokumentationsanlagen von der *Bio-Rad Laboratories GmbH* (München, D) verwendet.

Alle Zentrifugationen von Volumina bis 2 ml erfolgten in Zentrifugen der *Heraeus Holding GmbH* (Hanau, D). Zentrifugationen bei Raumtemperatur erfolgten, sofern nicht anders angegeben, in einer Tischzentrifuge „Biofuge pico“, alle Zentrifugationen bei 4 °C in einer Tisch-Kühlzentrifuge „Biofuge fresco“. Zentrifugationen von Volumina über 2ml wurden in einer Stand-Kühlzentrifuge „4K-15“ der *Sigma Laborzentrifugen GmbH* (Osterode am Harz, D) durchgeführt.

Zum Ermitteln der Sekundärstruktur wurde das Spektropolarimeter J-810 der *Jasco Deutschland GmbH* (Groß-Umstadt, D) verwendet. Quarzglasküvetten, mit einer Schichtdicke von 1 mm, wurden von *Hellma GmbH & Co. KG* (Müllheim, D) bezogen.

Das Mikokalorimeter ITC₂₀₀ von *Microcal* (*GE Healthcare*, München, D) wurde zur Bestimmung von Bindungskonstanten verwendet.

Für die Fluoreszenzmikroskopie wurde ein inverses Fluoreszenzmikroskop vom Typ Axiovert 200M (*Carl-Zeiss AG*, Oberkochen, D) benutzt. Das Mikroskop war mit einem Plan Apochromat Öl Objektiv (NA 1,4; *Zeiss*), einer Digitalkamera (*Hamamatsu*) und einem GFP- und DAPI-Filter-Set (*Zeiss*) ausgerüstet.

Zum Bestimmen von genauen Zellzahlen wurde der MultisizerTM3 von *Beckman Coulter* (Krefeld, D) verwendet.

4.2 Verbrauchsmaterialien

Labor-Verbrauchsmaterialien wurden von der *Sarstedt AG & Co.* (Nümbrecht, D) und *Greiner bio-one* (Frickenhausen, D) bezogen. Konzentratoren und Sterilfilter wurden bei *Merck Millipore KGaA* (Darmstadt, D) bestellt. Zur Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde das „Plasmid Mini Kit“ verwendet und zur Extraktion von DNA aus Agarosegelen das „QIAquick® Gel Extraction Kit“ (*Qiagen GmbH*, Hilden, D) oder das E.Z.N.A. Gel-Extraction-Kit (*Omega Bio-Tek*, Norcross, USA). Kristallisationslösungen wurden von *Qiagen GmbH* (Hilden, D) bezogen. Als weiteres Kristallisationszubehör wurden folgende Verbrauchsmaterialien geordert: 96-well Innovaplate (*Innovadyne*, Gebung, AUS), 24-NeXtal-Plate (*Qiagen GmbH*, Hilden, D), VIEWseal (*Greiner bio-one*, Frickenhausen, D) und Micromounts (*MiTeGen*, Inthaca, USA)

4.3 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien zur Herstellung von Lösungen, Puffern und Medien wurden, wenn nicht anderes angegeben, von den Firmen *Carl Roth GmbH & Co. KG* (Karlsruhe, D), *Merck KGaA* (Darmstadt, D), *Fluka* (*Sigma-Aldrich Chemie GmbH*, Steinheim, D), *Sigma-Aldrich Chemie GmbH* (Steinheim, D) und *VWR International GmbH* (Darmstadt, D) bezogen. Die beiden Fluoreszenzfarbstoffe Alexa Fluor® 488 Carboxylic Acid, 2,3,5,6-Tetrafluorophenyl Ester (A30005) und Alexa Fluor® 647 Carboxylic Acid, Succinimidyl Ester (A20006) von *Invitrogen* (*Life Technologies*, Grand Island, USA) wurden zum Markieren von Proteinproben verwendet.

4.4 Verwendete Saccharide und Oligosaccharide

Bei den folgenden Glykann handelt es sich um mögliche Glykanliganden, die mittels CFG-Analysen ermittelt wurden. Diese wurden bei den Firmen *Carl Roth GmbH & Co. KG* (Karlsruhe, D) und *Dextra Laboratories* (Reading, UK) bestellt. Sie wurden zur Co-Kristallisation sowie für verschiedene Bindungsstudien eingesetzt.

Tabelle 8: Verwendete Saccharide und Oligosaccharide.

Zucker	Zusammensetzung & Verknüpfung	Hersteller
Galactose	Gal	<i>Roth</i>
Lactose	Gal β 1-4Glc	<i>Roth</i>
T-Antigen	Gal β 1-3GalNAc	<i>DextraLabs</i>
Lacto- <i>N</i> -biose	Gal β 1-3GlcNAc	<i>DextraLabs</i>
<i>N</i> -Acetyl-D-lactosamin	Gal β 1-4GlcNAc	<i>DextraLabs</i>
α 1-3 Galactobiose	Gal α 1-3Gal	<i>DextraLabs</i>
P1-Antigen	Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc	<i>DextraLabs</i>
α 1-3, β 1-4 Galactotriose	Gal α 1-3Gal β 1-4Gal	<i>DextraLabs</i>
β 1-3 Gal- <i>N</i> -acetyl galactosaminyl- β 1-4 Gal- β 1-4-Glc	Gal β 1-3GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc	<i>DextraLabs</i>
Lacto- <i>N</i> -tatraose	Gal β 1-3GalNAc β 1-3Gal β 1-4Glc	<i>DextraLabs</i>
Lacto- <i>N</i> -neotetraose	Gal β 1-4GalNAc β 1-3Gal β 1-4Glc	<i>DextraLabs</i>

4.5 Enzyme

Restriktions- und Modifikationsenzyme wurden von der *Fermentas GmbH* (St. Leon-Rot, D) und *New England Biolabs Inc.* (Frankfurt, D) geordert. Als DNA-Größenstandards wurden „Gene Ruler 1 kb DNA Ladder“ und „Gene Ruler DNA ladder mix“ (*Fermentas GmbH*, St. Leon-Rot, D) verwendet. RNase A wurde von der *Metabion International AG* (Martinsried, D) bezogen. Verwendete Polymerasen wurden bei *Finnzymes* (Espoo, FIN) erworben. Für Ligationen wurde die T4 DNA Ligase von *Roche GmbH* (Mannheim, D) verwendet.

4.6 Antikörper

Der monoklonale Anti-HA Primärantikörper aus Mäusen (H3663) und der monoklonale Cy3-gekoppelte Anti-Maus IgG Sekundärantikörper (C2181) wurden von *Sigma-Aldrich Chemie GmbH* (Steinheim, D) produziert.

4.7 Primer

Synthetische Oligonukleotide wurden von *Metabion International AG* (Martinsried, D) synthetisiert.

Tabelle 9: Primer zur Herstellung von *E. coli* Expressionsplamiden.

Die Schittstellen (*Nde*I, *Nhe*I und *Xho*I) sind fett gekennzeichnet. Stopcodons sind rot unterlegt.

Name	Sequenz in 5'-3'-Richtung
Epa_1.2_NdeI	AAACATATGACATCTTCCAATGATATCAG
Epa_1.2_XhoI	AAACTCGAGTTAAGAAGAATCGTAGCTG
Epa_2-1	CCATATGCCTAAATCCAAGGATCCG
Epa2_Fwd_MA	AAAGCTAGCTCCAAGGATCCGACAAG
Epa_2-3	ACTCGAGTTAGCAGTGGTAGTTATAG
Epa_2-4	ACTCGAGTTAATTTTCTGACTTGGTG
Epa2_Rev_MA	AAACTCGAGTTAATATTACCTGGACATTGC
Epa_3-1	CCATATGAATGATCTTGGCTTTTC
Epa_3-2	CCATATGAAGCGAGAATTAAGTTCCT
Epa_3-3	ACTCGAGTTACCTGCATGTAGTATCG
Epa_3-4	ACTCGAGTTACAATGGATCTAGAAATCC
Epa6,7_AA26	CCATATGAAGGATGACTATTCTTCC
Epa6_AA271	CCTCGAGTTACGAAGTATCATAAC
Epa6,7_AA333	ACTCGAGTTATGTTGTTGGCACAC
Epa7_AA271	CCTCGAGTTACGAAGTATCATAACTAAC
Epa_8-2_NheI	AAAGCTAGCCAAAATTACAAGAGAGATG
Epa8_Fwd_MA	AAAGCTAGCTCAAGGGCACTATCAGAC
Epa_8-3	AAACTCGAGTTATGGATCCCAAATCC
Epa8_Rev_MA	AAACTCGAGTTAATGTATGCAGGGCATG
Epa_9-2_NheI	AAAGCTAGCGACATCACCCCGTTT G
Epa_9-3	AAACTCGAGTTAATCATCACAGACAGTC
Epa_10_NdeI	AAACATATGGACTTCACACCGTTTGCCC
Epa_10_XhoI	AAACTCGAGTTAATCGTCACAGACAGTTC
Epa_11-1	AAACATATGGCTCCTAATTACCCAG
Epa11_Fwd_MA	AAAGCTAGCTCAAATGCTCCTAATTACCC
Epa_11-3	AAACTCGAGTTACGAATTTATGGACCTAC
Epa11_Rev_MA	AAACTCGAGTTAATGCGTGCGGGACATTC
Epa_12-1	AAACATATGCTCGAACCTGATAATTC
Epa_12-3	AAACTCGAGTTATTCTTTCTCAGCTTGG
Epa_13-1	AAACATATGGCTCCTGAGTTCTAC
Epa13_Fwd_MA	AAAGCTAGCGACTCCTCCGAAAACGG
Epa_13-3	AAACTCGAGTTATATAGACCTGCACTC
Epa13_Rev_MA	AAACTCGAGTTAATATTTGCCGGACATTTAAC
Epa_15-1	AAACATATGTATGGATATCATGATCC
Epa15_Fwd_MA	AAAGCTAGCGATCCAACGACATTTCCCC
Epa_15-3	AAACTCGAGTTATGGTGATTGTACATC
Epa15_Rev_MA	AAACTCGAGTTAATTAACCAGGACAGCCG
Epa_19-1	AAACATATGTACTTTCCTAACTCTAAGG
Epa19_Fwd_MA	AAAGCTAGCTCTAAGGATCCAACAAG
Epa_19-3	AAACTCGAGTTAAGTTGATGATTTACATC

Epa19_Rev_MA	AAACTCGAG TTA AACTTCCTGGACATTG
Epa_20-2_NheI	AAAGCTAGCAGGGATTCTAACATTCC
Epa20_Fwd_MA	AAAGCTAGCTCTAACATTCCAAATAATTATCCC
Epa_20-3	AAACTCGAG TTA TCTAGGAAAATTCCCAC
Epa20_Rev_MA	AAACTCGAG TTA AACTTCTCCTGGGCAACCCCC
Epa_21-2_NheI	AAAGCTAGCCCAAATATAGAGAGCC
Epa21_Fwd_MA	AAAGCTAGCACACCAAATATAGAG
Epa_21-3	AAACTCGAG TTA TGGAGGGGAAGTAGTG
Epa21_Rev_MA	AAACTCGAG TTA AATATTAGCATCACAAAC
Epa_22_NdeI	AAACATATGAAACGAGCATTAAGTTC
Epa_22_XhoI	AAACTCGAG TTA CTTGCATGTAGTATCATAGCC
Epa_23-1	AAACATATGATTCCGAACCCATTC
Epa_23-1	AAACTCGAG TTA TCCTGATACATTACCAC

Tabelle 10: Primer zur Herstellung von Hefe-Expressionsplamiden.

Die Schittstellen (*SalI*, *SacII* und *SacI*) sind fett gekennzeichnet.

Name	Sequenz in 5'-3'-Richtung
SalI-SS-3HA-EpaXA	AAAG TCG ACATGCAAAGACCATTTCATTTCGC
1601-A2-SacI SacII	AAAGAGCT CCCCGCGG GAAGGAGGGGGATCCACTAG
Flo11-8	AAAGAGCTCGTTCCAATAGAAGCCTGGGAAATCTG
Epa_1.2_SacII	AAAC CGCGG ACATCTTCCAATGATATCAG
Epa_1.2_SacI	AAAGAGCTCAGAAGAATCGTAGCTG
Epa_2_SacII	AAAC CGCGG CCTAAATCCAAGGATC
Epa_2_SacI	AAAGAGCTCGCAGTGGTAGTTATAG
Epa_3.2_SacII	AAAC CGCGG AAGCGAGAATTAAGTTCCC
Epa_3_SacII	AAAC CGCGG AATGATCTTGGCTTTTC
Epa_3_SacI	AAAGAGCT CCCTG CATGTAGTATCG
Epa_6,7_SacII	AAAC CGCGG AAGGATGACTATTCTTCC
Epa_6,7_SacI	AAAGAGCT CCGA AGTATCATAACTAAC
Epa_8_SacII	AAAC CGCGG CAAAATTACAAGAGAGATG
Epa_8_SacI	AAAGAGCTCTGGAT CCCCAA ATCC
Epa_9_SacII	AAAC CGCGG GACATCACCCCGTTTG
Epa_9_SacI	AAAGAGCTCATCATCACAGACAGTC
Epa_11_SacII	AAAC CGCGG GCTCCTAATTACCCAG
Epa_11_SacI	AAAGAGCT CCGA ATTTATGGACCTAC
Epa_12_SacII	AAAC CGCGG CTCGAACCTGATAATTC
Epa_12_SacI	AAAGAGCTCTTCTTTCTCAGCTTGG
Epa_13_SacII	AAAC CGCGG GCTCCTGAGTTCTAC
Epa_13_SacI	AAAGAGCTCTATAGACCTGCACTC
Epa_15_SacII	AAAC CGCGG TATGGATATCATGATCC
Epa_15_SacI	AAAGAGCTCTGGTGATTGTACATC
Epa_19_SacII	AAAC CGCGG TACTTTCTAACTCTAAGG

Epa_19_SacI	AAAGAGCTCAGTTGATGATTTACATC
Epa_20_SacII	AAACCGCGGAGGGATTCTAACATTCC
Epa_20_SacI	AAAGAGCTCTCTAGGAAAATTCCCAC
Epa_21_SacII	AAACCGCGGCCAAATATAGAGAGCC
Epa_21_SacI	AAAGAGCTCTGGAGGGGAAGTAGTG
Epa_23_SacII	AAACCGCGGATTCCGAACCCATTC
Epa_23_SacI	AAAGAGCTCTCCTGATACATTACCAC

Tabelle 11: Mutageneseprimer.

Die zu mutierende CBL2-Region ist fett und blau gekennzeichnet

Name	Sequenz in 5'-3'-Richtung
Epa1zu2_Fwd	CCCTATTAGGTTATTTTATAATAAC AGAGATAATAAT GGTGCACCTCAGTTTTAC
Epa1zu2_Rev	GTAAAACTGAGTGCAC ATTATTATCTCT GTTATTATAAAATAACCTAATAGGG
Epa1zu3_Fwd	CCCTATTAGGTTATTTTATAATAAC ATAGAAAAAGAT GGTGCACCTCAGTTTTAC
Epa1zu3_Rev	GTAAAACTGAGTGCAC ATCTTTTCCTAT GTTATTATAAAATAACCTAATAGGG
Epa1zu6_Fwd	CCCTATTAGGTTATTTTATAATAAC ATAGGAAAAAGAT GGTGCACCTCAGTTTTAC
Epa1zu6_Rev	GTAAAACTGAGTGCAC ATCTTTTCCTAT GTTATTATAAAATAACCTAATAGGG
Epa1zu9_Fwd	CCCTATTAGGTTATTTTATAATAAC AGAGATTATCAT GGTGCACCTCAGTTTTAC
Epa1zu9_Rev	GTAAAACTGAGTGCAC ATGATAATCTCT GTTATTATAAAATAACCTAATAGGG
Epa2zu1_Fwd	CCTATTAGATTGTTCTATGTGAAT AGGGAATACGAT GCAGTTTTAGATTTTTC
Epa2zu1_Rev	GAAAAATCTAAAACTGC ATCGTATTCCCT ATTACATAGAACCAATCTAAT
Epa2zu3_Fwd	CCTATTAGATTGTTCTATGTGAAT ATTGGCAAGGAT GCAGTTTTAGATTTTTC
Epa2zu3_Rev	GAAAAATCTAAAACTGC ATCCTTGCCAAT ATTACATAGAACCAATCTAAT
Epa3zu1_Fwd	CCAATTCGGATGTTTTTAAACAAT AGAGAATACGACT CATCCTTAGATCTTTTC
Epa3zu1_Rev	GAAAGATCTAAGGATGA GTCGTATTCTCT ATTGTTAAAAACATCCGAATTGG
Epa3zu2_Fwd	CCAATTCGGATGTTTTTAAACAAT GAGGATAACAAC TCATCCTTAGATCTTTTC
Epa3zu2_Rev	GAAAGATCTAAGGATGA GTTGTTATCTCT ATTGTTAAAAACATCCGAATTGG
Epa6zu1_Fwd	CCAATTAGAATTTTCTTTAATAAT AGAGAATATGAT GGTGCATTAAGTCTAAC
Epa6zu1_Rev	GTTAGACTTAATGCAC ATCATATTCTCT ATTATTAAAGAAAATTCTAATTGG
Epa9zu1_Fwd	CCTATCAGGTTGTTTTACAACAAC AGAGAATATGAT TCGAAATTCATGGTTGGG
Epa9zu1_Rev	CCCAACCATGAATTTTGA ATCATATTCTCT GTTGTTGTAAACAACCTGATAGG

Tabelle 12: Sequenzierprimer.

Name	Sequenz in 5'-3'-Richtung
pJET1.2_Sequenzier_for	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC
pJET1.2_Sequenzier_rev	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG
T7 (f)	TAATACGACTCACTATAGGG
T7-Term (r)	GCTAGTTATTGCTCAGCGG
PGK-Sequenzier-Primer	GGGGGTGGTTTAGTTTAGTAGAACCTCG

4.8 Vektoren

4.8.1 pCR-Blunt II-TOPO

Der pCR-Blunt II-TOPO Vektor (*Invitrogen*) wurde zur Klonierung verschiedener PCR-Produkte, welche glatte Enden besitzen, genutzt. Der pCR-Blunt II-TOPO Vektor ist ein offenes Plasmid, welches mit der Topoisomerase I aus dem Vaccinia-Virus verknüpft ist. Die Funktion der Topoisomerase liegt in der Relaxation von DNA-Strängen, welche sie durch Spaltung und Wiederausbildung von Phosphodiesterbindungen nach Entwindung des DNA-Stranges realisiert. Somit besitzt die Topoisomerase auch eine Autoligasefunktion. Durch Zugabe von Fremd-DNA zum pCR-Blunt II-TOPO Vektorsystem können die beiden DNA-Fragmente miteinander ligiert werden. Der Vektor trägt das Kanamycin-Resistenzgen und wurde zur Konstruktion der *E. coli*- als auch Hefe-Expressionsplasmide verwendet.

4.8.2 pJET1.2

Der pJET1.2-Vektor (*Fermentas*) funktioniert nach dem gleichen Prinzip wie das pCR-Blunt II-TOPO Vektorsystem. Auch er wurde zur Klonierung verschiedener PCR-Produkte mit glatten Enden eingesetzt. Der Vektor trägt das Ampicillin-Resistenzgen und wurde zur Konstruktion der *E. coli*- als auch Hefe-Expressionsplasmide verwendet.

4.8.3 pET-28a(+)-Vektor

Der pET-28a(+)-Vektor (*Novagen*) dient als *E. coli* Expressionsplasmid und wurde zur Produktion der in dieser Arbeit rekombinant hergestellten Proteine verwendet. Die Transkription findet durch die T7-RNA-Polymerase statt. Die T7-RNA-Polymerase aus dem T7-Bakteriophagen ist extrem promotorspezifisch, weshalb nur DNA transkribiert wird, die stromabwärts des T7*lac*-Promotors liegt. Die in der genomischen DNA des Expressionsstammens kodierte Polymerase steht unter der Kontrolle des *lacUV5*-Promotors. An diesem bindet ein *lac*-Repressor, welcher durch das Gen *lacI* kodiert wird. Durch Zugabe von IPTG lässt sich die Repression lösen. Die Expression des Zielgens unter Kontrolle des T7*lac*-Promotors wird ebenfalls durch *lacI* reprimiert und durch IPTG induziert. Der Vektor ermöglicht die Fusion eines N- als auch eines C-terminalen His₆-Tags Die für die gewünschten Proteine kodierenden Sequenzen

wurden über die Schnittstellen *NdeI* und *XhoI* bzw. *NheI* und *XhoI* in die *Multiple Cloning Site* des pET-28a(+)-Vektor kloniert, weshalb die Zielproteine mit einem N-terminalen His₆-Tag hergestellt werden. Der Vektor trägt das Kanamycin-Resistenzgen.

4.8.4 YCplac33

Der YCplac33-Vektor dient zu Herstellung der Hefe-Expressionsplasmide. YCplac33 ist ein Centromer-Vektor. Durch die Centromer-Sequenz weist er eine hohe mitotische Stabilität auf. Er kommt in einfacher Kopienzahl pro Hefezelle vor. Zudem besitzt er eine hohe Transformationseffizienz. Die Nummer 33 steht für den Selektionsmarker. Durch Transformation mit diesem Plasmid werden die *S. cerevisiae*-Zellen auxotroph für Uracil. Der Vektor trägt das Ampicillin-Resistenzgen.

4.9 Verwendete Konstrukte

Auftragssequenzierungen wurden bei *SeqLab GmbH* (Göttingen, D) und *Qiagen GmbH* (Hilden, D) durchgeführt.

4.9.1 Vorläuferplasmide zur Sicherung der PCR-Produkte

Die verschiedenen *EPAA*-Domänen wurden mittels PCR und der genomischen DNA des *C. glabrata* Stammes CBS138 als Template amplifiziert und zur Sicherung in die Suizidvektoren pCR-Blunt II-TOPO und pET1.2 ligiert. Dabei entstanden die folgenden Zwischenprodukte.

Tabelle 13: Vorläuferplasmide zur Herstellung der *E. coli* Expressionsplasmide.

Inserts können über *NdeI* und *XhoI* oder *NheI* und *XhoI* aus den pJET1.2- oder pCR-Blunt-II-TOPO-Konstrukten rausgeschnitten werden.

BHUM-Nummer	Insert	Referenz
BHUM2497	<i>EPA1</i> ^(AS31-271;N228Y;D229H)	Diese Arbeit
BHUM1794	<i>EPA2</i> ^(AS32-262)	Diese Arbeit
BHUM1795	<i>EPA2</i> ^(AS32-329)	Diese Arbeit
BHUM2313	<i>EPA2</i> ^(AS34-256)	Diese Arbeit
BHUM2312	<i>EPA2</i> ^(AS32-256)	Diese Arbeit

BHUM2499	<i>EPA2</i> ^(AS32-262;D218E;N219Y;N220D)	Diese Arbeit
BHUM2501	<i>EPA2</i> ^(AS32-262;R217I;D218G;N219K;N220D)	Diese Arbeit
BHUM1796	<i>EPA3</i> ^(AS19-266)	Diese Arbeit
BHUM1797	<i>EPA3</i> ^(AS19-319)	Diese Arbeit
BHUM1798	<i>EPA3</i> ^(AS28-266)	Diese Arbeit
BHUM1799	<i>EPA3</i> ^(AS28-319)	Diese Arbeit
BHUM2503	<i>EPA3</i> ^(AS28-267;I220R;G221E;K222Y)	Diese Arbeit
BHUM2505	<i>EPA3</i> ^(AS28-267;I220R;G221D;K222N;D223N)	Diese Arbeit
BHUM2507	<i>EPA6</i> ^(AS26-271;D227E;N228Y)	Diese Arbeit
BHUM1800	<i>EPA7</i> ^(AS26-271)	Diese Arbeit
BHUM1881	<i>EPA8</i> ^(AS27-317)	Diese Arbeit
BHUM2315	<i>EPA8</i> ^(AS36-259)	Diese Arbeit
BHUM2313	<i>EPA8</i> ^(AS27-259)	Diese Arbeit
BHUM1882	<i>EPA9</i> ^(AS39-305)	Diese Arbeit
BHUM2509	<i>EPA9</i> ^(AS39-305;D258E;H260D)	Diese Arbeit
BHUM2493	<i>EPA10</i> ^(AS39-306)	Diese Arbeit
BHUM1833	<i>EPA11</i> ^(AS35-290)	Diese Arbeit
BHUM2317	<i>EPA11</i> ^(AS33-254)	Diese Arbeit
BHUM2316	<i>EPA11</i> ^(AS35-254)	Diese Arbeit
BHUK1862	<i>EPA12</i> ^(AS26-292)	Diese Arbeit
BHUM1863	<i>EPA13</i> ^(AS22-261)	Diese Arbeit
BHUM2319	<i>EPA13</i> ^(AS30-252)	Diese Arbeit
BHUM2318	<i>EPA13</i> ^(AS22-252)	Diese Arbeit
BHUM1864	<i>EPA15</i> ^(AS37-277)	Diese Arbeit
BHUM2321	<i>EPA15</i> ^(AS41-265)	Diese Arbeit
BHUM2320	<i>EPA15</i> ^(AS37-265)	Diese Arbeit
BHUM1837	<i>EPA19</i> ^(AS30-269)	Diese Arbeit
BHUM2323	<i>EPA19</i> ^(AS34-256)	Diese Arbeit
BHUM2322	<i>EPA19</i> ^(AS30-256)	Diese Arbeit
BHUM1883	<i>EPA20</i> ^(AS32-290)	Diese Arbeit
BHUM2325	<i>EPA20</i> ^(AS33-279)	Diese Arbeit
BHUM2324	<i>EPA20</i> ^(AS31-279)	Diese Arbeit
BHUM1884	<i>EPA21</i> ^(AS32-280)	Diese Arbeit
BHUM2327	<i>EPA21</i> ^(AS31-255)	Diese Arbeit
BHUM2326	<i>EPA21</i> ^(AS32-255)	Diese Arbeit
BHUM2494	<i>EPA22</i> ^(AS28-266)	Diese Arbeit
BHUM1865	<i>EPA23</i> ^(AS22-280)	Diese Arbeit

Tabelle 14: Vorläuferplasmide zur Herstellung der Hefe-Expressionsplasmide.

Inserts können über *SacII* und *SacI* oder *SalI* und *SacI* aus den pJET1.2- oder pCR-Blunt-II-TOPO-Konstrukten rausgeschnitten werden.

BHUM-Nummer	Insert	Referenz
BHUM1958	<i>FLO11</i> ^(AS1-30) - <i>SP-3HA</i>	Diese Arbeit
BHUM1997	<i>FLO11</i> ^(AS1-30) - <i>SP-3HA-FLO11</i> ^(AS31-257)	Diese Arbeit
BHUM1830	<i>EPA1</i> ^(AS31-271)	Diese Arbeit
BHUM1801	<i>EPA1</i> ^(AS31-271;E220D;Y221N;D222N)	Diese Arbeit
BHUM1831	<i>EPA1</i> ^(AS31-271;R219I,E220G;Y221K)	Diese Arbeit
BHUM1803	<i>EPA1</i> ^(AS31-271;E220D;Y221N)	Diese Arbeit
BHUM2159	<i>EPA1</i> ^(AS31-271;N228Y;D229H)	Diese Arbeit
BHUM2166	<i>EPA1</i> ^(AS31-271;C78S)	Diese Arbeit
BHUM2167	<i>EPA1</i> ^(AS31-271;D165A)	Diese Arbeit
BHUM2168	<i>EPA1</i> ^(AS31-271;W198A)	Diese Arbeit
BHUM2169	<i>EPA1</i> ^(AS31-271;W198H)	Diese Arbeit
BHUM2170	<i>EPA1</i> ^(AS31-271;W198Y)	Diese Arbeit
BHUM1854	<i>EPA2</i> ^(AS32-262)	Diese Arbeit
BHUM2183	<i>FLO11</i> ^(AS1-30) - <i>SP-3HA-EPA2</i> ^(AS32-262;D218E;N219Y;N220D)	Diese Arbeit
BHUM2184	<i>FLO11</i> ^(AS1-30) - <i>SP-3HA-EPA2</i> ^(AS32-262;R217I;D218G;N219K;N220D)	Diese Arbeit
BHUM1890	<i>EPA3</i> ^(AS28-266)	Diese Arbeit
BHUM2185	<i>FLO11</i> ^(AS1-30) - <i>SP-3HA-EPA3</i> ^(AS28-267;I220R;G221E;K222Y)	Diese Arbeit
BHUM2186	<i>FLO11</i> ^(AS1-30) - <i>SP-3HA-EPA3</i> ^(AS28-267;I220R;G221D;K222N;D223N)	Diese Arbeit
BHUM1832	<i>EPA6</i> ^(AS26-271)	Diese Arbeit
BHUM2187	<i>FLO11</i> ^(AS1-30) - <i>SP-3HA-EPA6</i> ^(AS26-271;D227E;N228Y)	Diese Arbeit
BHUM1856	<i>EPA7</i> ^(AS26-271)	Diese Arbeit
BHUM1903	<i>EPA8</i> ^(AS27-317)	Diese Arbeit
BHUM1904	<i>EPA9</i> ^(AS39-305)	Diese Arbeit
BHUM2188	<i>FLO11</i> ^(AS1-30) - <i>SP-3HA-EPA9</i> ^(AS39-305;D258E;H260D)	Diese Arbeit
BHUM1905	<i>EPA11</i> ^(AS35-290)	Diese Arbeit
BHUM1906	<i>EPA12</i> ^(AS26-292)	Diese Arbeit
BHUM1907	<i>EPA13</i> ^(AS22-261)	Diese Arbeit
BHUM1908	<i>EPA15</i> ^(AS37-277)	Diese Arbeit
BHUM1909	<i>EPA19</i> ^(AS30-269)	Diese Arbeit
BHUM1910	<i>EPA20</i> ^(AS32-290)	Diese Arbeit
BHUM1911	<i>EPA21</i> ^(AS32-280)	Diese Arbeit
BHUM1912	<i>EPA23</i> ^(AS22-280)	Diese Arbeit

4.9.2 *E. coli* Expressionsplasmide

Die verschiedenen *EPAA*-Domänen wurden, nach Überprüfung durch Sequenzierung, aus den verschiedenen Vorläuferkonstrukten mittels der Restriktionsenzyme *NdeI* und *XhoI* bzw. *NheI* und *XhoI* aus den Suizidvektoren geschnitten. Anschließend erfolgte die Insertion in den pET-28a(+) *E. coli* Expressionsvektor. Die folgenden Konstrukte wurden für die darauf folgende heterologe Überexpression in *E. coli* herangezogen. Die Plasmide aus der AG Essen wurden von Manuel Maestre-Reyna hergestellt (Maestre-Reyna, *et al.*, 2012).

Tabelle 15: *E. coli* Expressionsplasmide.

BHUM-Nummer	Insert	Referenz
BHUM1829	<i>His₆-EPA1</i> ^(AS31-271)	AG Essen
BHUM1804	<i>His₆-EPA1</i> ^(AS31-271;E220D;Y221N;D222N)	AG Essen
BHUM1805	<i>His₆-EPA1</i> ^(AS31-271;R219I,E220G;Y221K)	AG Essen
BHUM1806	<i>His₆-EPA1</i> ^(AS31-271;E220D;Y221N)	AG Essen
BHUM2498	<i>His₆-EPA1</i> ^(AS31-271;N228Y;D229H)	Diese Arbeit
BHUM2161	<i>His₆-EPA1</i> ^(AS31-271;C78S)	AG Essen
BHUM2162	<i>His₆-EPA1</i> ^(AS31-271;D165A)	AG Essen
BHUM2163	<i>His₆-EPA1</i> ^(AS31-271;W198A)	AG Essen
BHUM2164	<i>His₆-EPA1</i> ^(AS31-271;W198H)	AG Essen
BHUM2165	<i>His₆-EPA1</i> ^(AS31-271;W198Y)	AG Essen
BHUM1784	<i>His₆-EPA2</i> ^(AS32-262)	Diese Arbeit
BHUM1785	<i>His₆-EPA2</i> ^(AS32-329)	Diese Arbeit
BHUM2329	<i>His₆-EPA2</i> ^(AS34-256)	Diese Arbeit
BHUM2128	<i>His₆-EPA2</i> ^(AS32-256)	Diese Arbeit
BHUM2500	<i>His₆-EPA2</i> ^(AS32-262;D218E;N219Y;N220D)	Diese Arbeit
BHUM2502	<i>His₆-EPA2</i> ^(AS32-262;R217I;D218G;N219K;N220D)	Diese Arbeit
BHUM1786	<i>His₆-EPA3</i> ^(AS19-266)	Diese Arbeit
BHUM1787	<i>His₆-EPA3</i> ^(AS19-319)	Diese Arbeit
BHUM1788	<i>His₆-EPA3</i> ^(AS28-266)	Diese Arbeit
BHUM1789	<i>His₆-EPA3</i> ^(AS28-319)	Diese Arbeit
BHUM2504	<i>His₆-EPA3</i> ^(AS28-267;I220R;G221E;K222Y)	Diese Arbeit
BHUM2506	<i>His₆-EPA3</i> ^(AS28-267;I220R;G221D;K222N;D223N)	Diese Arbeit

BHUM1790	<i>His₆-EPA6</i> ^(AS26-271)	Diese Arbeit
BHUM1791	<i>His₆-EPA6</i> ^(AS26-333)	Diese Arbeit
BHUM2508	<i>His₆-EPA6</i> ^(AS26-271;D227E;N228Y)	Diese Arbeit
BHUM1792	<i>His₆-EPA7</i> ^(AS26-271)	Diese Arbeit
BHUM1793	<i>His₆-EPA7</i> ^(AS26-333)	Diese Arbeit
BHUM1885	<i>His₆-EPA8</i> ^(AS27-317)	Diese Arbeit
BHUM2331	<i>His₆-EPA8</i> ^(AS36-259)	Diese Arbeit
BHUM2330	<i>His₆-EPA8</i> ^(AS27-259)	Diese Arbeit
BHUM1886	<i>His₆-EPA9</i> ^(AS39-305)	Diese Arbeit
BHUM2510	<i>His₆-EPA9</i> ^(AS39-305;D258E;H260D)	Diese Arbeit
BHUM2495	<i>His₆-EPA10</i> ^(AS39-306)	Diese Arbeit
BHUM1853	<i>His₆-EPA11</i> ^(AS35-290)	Diese Arbeit
BHUM2333	<i>His₆-EPA11</i> ^(AS33-254)	Diese Arbeit
BHUM2332	<i>His₆-EPA11</i> ^(AS35-254)	Diese Arbeit
BHUM1873	<i>His₆-EPA12</i> ^(AS26-292)	Diese Arbeit
BHUM1874	<i>His₆-EPA13</i> ^(AS22-261)	Diese Arbeit
BHUM2335	<i>His₆-EPA13</i> ^(AS30-252)	Diese Arbeit
BHUM2334	<i>His₆-EPA13</i> ^(AS22-252)	Diese Arbeit
BHUM1875	<i>His₆-EPA15</i> ^(AS37-277)	Diese Arbeit
BHUM2337	<i>His₆-EPA15</i> ^(AS41-265)	Diese Arbeit
BHUM2336	<i>His₆-EPA15</i> ^(AS37-265)	Diese Arbeit
BHUM1857	<i>His₆-EPA19</i> ^(AS30-269)	Diese Arbeit
BHUM2339	<i>His₆-EPA19</i> ^(AS34-256)	Diese Arbeit
BHUM2338	<i>His₆-EPA19</i> ^(AS30-256)	Diese Arbeit
BHUM1887	<i>His₆-EPA20</i> ^(AS32-290)	Diese Arbeit
BHUM2341	<i>His₆-EPA20</i> ^(AS33-279)	Diese Arbeit
BHUM2340	<i>His₆-EPA20</i> ^(AS31-279)	Diese Arbeit
BHUM1888	<i>His₆-EPA21</i> ^(AS32-280)	Diese Arbeit
BHUM2343	<i>His₆-EPA21</i> ^(AS31-255)	Diese Arbeit
BHUM2342	<i>His₆-EPA21</i> ^(AS32-255)	Diese Arbeit
BHUM2396	<i>His₆-EPA22</i> ^(AS28-266)	Diese Arbeit
BHUM1876	<i>His₆-EPA23</i> ^(AS22-280)	Diese Arbeit

Durch Insertion der verschiedenen *EPAA*-Domänen in BHUM2157 konnten diese mit der *BC*-Domäne von *FLO11* fusioniert werden. Zudem erfolgte die Verknüpfung mit einem einheitlichen Sekretionssignal (*FLO11*^{AS1-30}), einer Spacer-Sequenz (*SP*) und einem 3HA-Epitop (*3HA*). Die Spacer-Sequenz (AGC GGT GGC GGC CGC ATC TTT) gewährleistet aus unbekannten Gründen die Funktion des 3HA-Epitops. Ein weiterer Vorteil ist, dass die Expression der verschiedenen Fusionsproteine unter Kontrolle des konstitutiven *PGK1*-Promotors stehen. Nachfolgend sind die Hefe-Expressionsplasmide aufgelistet, die in den *in vivo* Untersuchungen eingesetzt wurden.

Tabelle 16: Hefe-Expressionsplasmide.

BHUM-Nummer	Insert	Referenz
B2445	YCplac33	AG Mösch
BHUM1964	<i>P_{PGK1}-FLO11</i> ^(AS1-25) - <i>FLO11</i> ^(AS214-1360) - <i>T_{FLO11}</i>	Vera Duwe
BHUM2157	<i>P_{PGK1}-FLO11</i> ^(AS1-30) - <i>SP-3HA-FLO11</i> ^(AS214-1360) - <i>T_{FLO11}</i>	Diese Arbeit
BHUM2158	<i>P_{PGK1}-FLO11</i> ^(AS1-30) - <i>SP-3HA-FLO11</i> ^(AS31-257) - <i>FLO11</i> ^(AS214-1360) - <i>T_{FLO11}</i>	Diese Arbeit
BHUM1983	<i>P_{PGK1}-FLO11</i> ^(AS1-30) - <i>SP-3HA-EPA1</i> ^(AS31-271) - <i>FLO11</i> ^(AS214-1360) - <i>T_{FLO11}</i>	Diese Arbeit
BHUM1984	<i>P_{PGK1}-FLO11</i> ^(AS1-30) - <i>SP-3HA-EPA1</i> ^(AS31-271;R219I,E220G;Y221K) - <i>FLO11</i> ^(AS214-1360) - <i>T_{FLO11}</i>	Diese Arbeit
BHUM2016	<i>P_{PGK1}-FLO11</i> ^(AS1-30) - <i>SP-3HA-EPA1</i> ^(AS31-271;E220D;Y221N) - <i>FLO11</i> ^(AS214-1360) - <i>T_{FLO11}</i>	Diese Arbeit
BHUM2017	<i>P_{PGK1}-FLO11</i> ^(AS1-30) - <i>SP-3HA-EPA1</i> ^(AS31-271;E220D;Y221N) - <i>FLO11</i> ^(AS214-1360) - <i>T_{FLO11}</i>	Diese Arbeit
BHUM2160	<i>P_{PGK1}-FLO11</i> ^(AS1-30) - <i>SP-3HA-EPA1</i> ^(AS31-271;N228Y;D229H) - <i>FLO11</i> ^(AS214-1360) - <i>T_{FLO11}</i>	Diese Arbeit
BHUM2171	<i>P_{PGK1}-FLO11</i> ^(AS1-30) - <i>SP-3HA-EPA1</i> ^(AS31-271;C78S) - <i>FLO11</i> ^(AS214-1360) - <i>T_{FLO11}</i>	Diese Arbeit
BHUM2172	<i>P_{PGK1}-FLO11</i> ^(AS1-30) - <i>SP-3HA-EPA1</i> ^(AS31-271;D165A) - <i>FLO11</i> ^(AS214-1360) - <i>T_{FLO11}</i>	Diese Arbeit
BHUM2173	<i>P_{PGK1}-FLO11</i> ^(AS1-30) - <i>SP-3HA-EPA1</i> ^(AS31-271;W198A) - <i>FLO11</i> ^(AS214-1360) - <i>T_{FLO11}</i>	Diese Arbeit
BHUM2174	<i>P_{PGK1}-FLO11</i> ^(AS1-30) - <i>SP-3HA-EPA1</i> ^(AS31-271;W198H) - <i>FLO11</i> ^(AS214-1360) - <i>T_{FLO11}</i>	Diese Arbeit
BHUM2175	<i>P_{PGK1}-FLO11</i> ^(AS1-30) - <i>SP-3HA-EPA1</i> ^(AS31-271;W198Y) - <i>FLO11</i> ^(AS214-1360) - <i>T_{FLO11}</i>	Diese Arbeit
BHUM1985	<i>P_{PGK1}-FLO11</i> ^(AS1-30) - <i>SP-3HA-EPA2</i> ^(AS32-262) - <i>FLO11</i> ^(AS214-1360) - <i>T_{FLO11}</i>	Diese Arbeit
BHUM2189	<i>P_{PGK1}-FLO11</i> ^(AS1-30) - <i>SP-3HA-EPA2</i> ^(AS32-262;D218E;N219Y;N220D) - <i>FLO11</i> ^(AS214-1360) - <i>T_{FLO11}</i>	Diese Arbeit
BHUM2190	<i>P_{PGK1}-FLO11</i> ^(AS1-30) - <i>SP-3HA-EPA1</i> ^{EPA2(AS32-262;R217I;D218G;N219K;N220D)} - <i>FLO11</i> ^(AS214-1360) - <i>T_{FLO11}</i>	Diese Arbeit

BHUM2150	$P_{PGK1}\text{-FLO11}^{(AS1-30)}\text{-SP-3HA-EPA3}^{(AS28-266)}\text{-FLO11}^{(AS214-1360)}\text{-T}_{FLO11}$	Diese Arbeit
BHUM2191	$P_{PGK1}\text{-FLO11}^{(AS1-30)}\text{-SP-3HA-EPA3}^{(AS28-267;I220R;G221E;K222Y)}\text{-FLO11}^{(AS214-1360)}\text{-T}_{FLO11}$	Diese Arbeit
BHUM2192	$P_{PGK1}\text{-FLO11}^{(AS1-30)}\text{-SP-3HA-EPA3}^{(AS28-267;I220R;G221D;K222N;D223N)}\text{-FLO11}^{(AS214-1360)}\text{-T}_{FLO11}$	Diese Arbeit
BHUM2018	$P_{PGK1}\text{-FLO11}^{(AS1-30)}\text{-SP-3HA-EPA6}^{(AS26-271)}\text{-FLO11}^{(AS214-1360)}\text{-T}_{FLO11}$	Diese Arbeit
BHUM2193	$P_{PGK1}\text{-FLO11}^{(AS1-30)}\text{-SP-3HA-EPA6}^{(AS26-271;D227E;N228Y)}\text{-FLO11}^{(AS214-1360)}\text{-T}_{FLO11}$	Diese Arbeit
BHUM1998	$P_{PGK1}\text{-FLO11}^{(AS1-30)}\text{-SP-3HA-EPA7}^{(AS26-271)}\text{-FLO11}^{(AS214-1360)}\text{-T}_{FLO11}$	Diese Arbeit
BHUM2051	$P_{PGK1}\text{-FLO11}^{(AS1-30)}\text{-SP-3HA-EPA8}^{(AS27-317)}\text{-FLO11}^{(AS214-1360)}\text{-T}_{FLO11}$	Diese Arbeit
BHUM2020	$P_{PGK1}\text{-FLO11}^{(AS1-30)}\text{-SP-3HA-EPA9}^{(AS39-305)}\text{-FLO11}^{(AS214-1360)}\text{-T}_{FLO11}$	Diese Arbeit
BHUM2194	$P_{PGK1}\text{-FLO11}^{(AS1-30)}\text{-SP-3HA-EPA9}^{(AS39-305;D258E;H260D)}\text{-FLO11}^{(AS214-1360)}\text{-T}_{FLO11}$	Diese Arbeit
BHUM2152	$P_{PGK1}\text{-FLO11}^{(AS1-30)}\text{-SP-3HA-EPA11}^{(AS35-290)}\text{-FLO11}^{(AS214-1360)}\text{-T}_{FLO11}$	Diese Arbeit
BHUM2153	$P_{PGK1}\text{-FLO11}^{(AS1-30)}\text{-SP-3HA-EPA12}^{(AS26-292)}\text{-FLO11}^{(AS214-1360)}\text{-T}_{FLO11}$	Diese Arbeit
BHUM1987	$P_{PGK1}\text{-FLO11}^{(AS1-30)}\text{-SP-3HA-EPA13}^{(AS22-261)}\text{-FLO11}^{(AS214-1360)}\text{-T}_{FLO11}$	Diese Arbeit
BHUM2154	$P_{PGK1}\text{-FLO11}^{(AS1-30)}\text{-SP-3HA-EPA15}^{(AS37-277)}\text{-FLO11}^{(AS214-1360)}\text{-T}_{FLO11}$	Diese Arbeit
BHUM2155	$P_{PGK1}\text{-FLO11}^{(AS1-30)}\text{-SP-3HA-EPA19}^{(AS30-269)}\text{-FLO11}^{(AS214-1360)}\text{-T}_{FLO11}$	Diese Arbeit
BHUM2156	$P_{PGK1}\text{-FLO11}^{(AS1-30)}\text{-SP-3HA-EPA20}^{(AS32-290)}\text{-FLO11}^{(AS214-1360)}\text{-T}_{FLO11}$	Diese Arbeit
BHUM1993	$P_{PGK1}\text{-FLO11}^{(AS1-30)}\text{-SP-3HA-EPA21}^{(AS32-280)}\text{-FLO11}^{(AS214-1360)}\text{-T}_{FLO11}$	Diese Arbeit
BHUM1988	$P_{PGK1}\text{-FLO11}^{(AS1-30)}\text{-SP-3HA-EPA23}^{(AS22-280)}\text{-FLO11}^{(AS214-1360)}\text{-T}_{FLO11}$	Diese Arbeit

4.10 Stämme und Zelllinien

4.10.1 Bakterienstämme

4.10.1.1 *E. coli* DH5 α

Genotyp: *F- Φ 80lacZAM15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (r_k^- , m_k^+) phoA supE44 λ - thi-1 gyrA96 relA1*

Chemisch kompetente *E. coli* DH5 α -Zellen (*Invitrogen*) wurden zur Plasmidgewinnung eingesetzt, da sie eine hohe Plasmidreplikationsrate besitzen. Eine Mutation im Gen *endA1* inaktiviert eine intrazelluläre Endonuklease, die bei der Plasmidherstellung degradierend wirken würde. Weitere Restriktionsendonukleasen wurden durch Mutationen deaktiviert und ein Amber-Suppressor eingeführt. DH5 α ist nicht als Expressionsstamm für pET-Vektoren geeignet, da er keine chromosomale Kopie der T7-RNA-Polymerase besitzt.

4.10.1.2 *E. coli* TOP10F'

Genotyp: *F'* {*lacI^q* *Tn10* (*Tet^R*)} *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *araD139* Δ (*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* *endA1* *nupG*

Chemisch kompetente *E. coli* TOP10F'-Zellen (*Invitrogen*) wurden, wie auch die DH5 α -Zellen, zur Plasmidgewinnung aufgrund ihrer hohen Plasmidreplikationsrate eingesetzt. Zudem weisen sie eine hohe Transformationseffizienz auf, weshalb sie bevorzugt bei der Transformation verschiedener Ligationsansätze verwendet wurden.

4.10.1.3 *E. coli* SHuffle T7 Express

Genotyp: *fhuA2* *lacZ::T7* *gene1* [*lon*] *ompT* *ahpC* *gal* *att::pNEB3-r1-cDsbC* (*Spec^R*, *lacI^q*) Δ *trxB* *sulA11* *R(mcr-73::miniTn10--Tet^S)2* [*dcm*] *R(zgb-210::Tn10 --Tet^S)* *endA1* Δ *gor* Δ (*mcrC-mrr*)114::*IS10*

Der *E. coli* Stamm Shuffle T7 Express (*NEB GmbH*) wurde in dieser Arbeit als Expressionsstamm eingesetzt. Aufgrund von Mutationen in der Thioredoxin-Reduktase und der Glutathion-Reduktase gewährleistet er ein oxidatives Milieu im Cytosol. Zudem enthält dieser Stamm eine Disulfidisomerase DsbC, welche Disulfidbrücken spaltet und neu knüpfen kann. Der Organismus ist mit einer Spectinomycin-Resistenz ausgestattet und enthält eine T7-RNA-Polymerase, die zur heterologen Proteinproduktion benötigt wird.

4.10.2 Hefestämme

4.10.2.1 *S. cerevisiae* BY4741

Genotyp: *S288c* *MATa* *his3 Δ 1* *leu2 Δ 0* *met15 Δ 0* *ura3 Δ 0*

In den haploiden *MATa S. cerevisiae* Stamm wurden die verschiedenen Hefe-Expressionsplasmide transformiert. Aufgrund des S288c Stammhintergrundes ist eine Mutation im Transkriptionsfaktor Flo8 vorhanden, weshalb Flo11 nicht produziert wird. Dies führt dazu, dass die einzelnen Hefezellen nicht aneinander kleben, was eine Auszählung der Zellen ermöglicht, um in folgenden Untersuchungen eine quantitative Aussage treffen zu können.

4.10.2.2 *C. glabrata* ATCC2001

Genotyp: *C. glabrata* Wildtyp-Stamm CBS138

Die genomische DNA des *C. glabrata* Wildtyp-Stammes wurde von Steffen Rupp (Fraunhofer Institut für Grenzflächen und Bioverfahrenstechnik, Stuttgart) zur Verfügung gestellt. *C. glabrata* ist eine haploider Hefepilz der Gattung *Candida*. Auf der genomischen DNA des verwendeten Wildtyp-Stammes sind 17 verschiedene Gene der Epa-Familie codiert. In dieser Arbeit diente lediglich die genomische DNA als Template zur Amplifikation der verschiedenen *EPAA*-Domänen.

4.10.3 Zelllinien

4.10.3.1 Caco-2 ATCC HTB-37

In dieser Arbeit wurde ausschließlich die humane Kolonkarzinom-Zelllinie Caco-2 (ATCC HTB-37) verwendet. Die Zellen wurden 1974 durch den dänischen Arzt Fogh von einem Dickdarmtumor eines 72-jährigen Kaukasiers isoliert und charakterisiert. Der Tumor entwickelte sich aus den Epithelzellen der Darmschleimhaut. Die Zellen besitzen einen hypertetraploiden Chromosomensatz bei einer mittleren Chromosomenzahl von 96. Des Weiteren zeigen sie adhärentes Wachstum bei charakteristischer enterozytischer Differenzierung. Somit können sie auf Oberflächen wie Plastik zu einem konfluenten Zellverband kultiviert werden und behalten die morphologischen und physiologischen Eigenschaften bei, die charakteristisch für das menschliche Darmepithel sind. Demnach stellt diese Zelllinie ein ideales Testsystem dar, um die Adhäsionseigenschaften verschiedener EpaA-Domänen auf der Basis menschlicher Epithelzellen zu untersuchen.

4.11 Medien, Puffer und Stammlösungen

4.11.1 Medien

Die verwendeten Nährmedien wurden mit dH₂O angesetzt. Für Festmedien wurde 2 % Agar zugegeben. Bei der Herstellung von SC-Festmedium wurden 4 % Agar und 2-fach konzentriertes SC-Medium getrennt voneinander autoklaviert und nach dem Autoklavieren zusammengegeben.

4.11.1.1 Nährmedien für *E. coli*

LB- und TB-Medium wurde bei der analytischen und präparativen heterologen Überexpression eingesetzt. SOC-Medium wurde bei Transformation verschiedener Ligationsansätze verwendet, da aufgrund des erhöhten Nährstoffgehalts die Transformationseffizienz gesteigert wird. 2YT-Medium wurde zur Herstellung von chemisch kompetenten *E. coli* Zellen verwendet.

Tabelle 17: Nährmedien für *E. coli*.

Name	Zusammensetzung
LB-Medium	0,5 % (v/v) Hefeextrakt 1 % (w/v) Trypton 1 % (w/v) NaCl
TB-Medium	24 % (w/v) Hefeextrakt 12 % (w/v) Trypton 4 % (v/v) Glycerin nach Autoklavieren Phosphat-Puffer 1:10 zugeben
Phosphat-Puffer	0,17 M KH ₂ PO ₄ 0,72 M K ₂ HPO ₄
SOC-Medium	0,5 % (w/v) Hefeextrakt 2 % (w/v) Trypton 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ 20 mM Glucose
2YT-Medium	10 % (w/v) Hefeextrakt 16 % (w/v) Trypton 5 % (w/v) NaCl

4.11.1.2 Nährmedien für *S. cerevisiae*

Auf YPD-Vollmedium wurde der *S. cerevisiae* Stamm BY4741 ausgestrichen und zur Herstellung kompetenter Zellen angezogen. SC-Ura Medium dient zur Selektion Plasmid-tragender-Stämme. In LMF-Medium wurden die Plasmid-tragenden-Hefen für die Mikroskopie herangezogen. Adhäsionstests an Agar und Polystyrol wurden mit YPD-, SC-Ura- und YNB-Medium durchgeführt. Für die Adhäsion an Caco-2 Zellen wurden die Plasmidtragenden Hefen in YPD-Medium angezogen.

Tabelle 18: Nährmedien für *S. cerevisiae*.

Name	Zusammensetzung
YPD-Medium	1 % (w/v) Hefeextrakt 2 % (w/v) Trypton 2 % (w/v) Glucose
SC-Ura	0,15 % (w/v) Yeast Nitrogen Base 0,5 % (w/v) (NH ₄) ₂ SO ₄ 0,2 % (w/v) Aminosäuremischung nach Autoklavieren zugegen: 0,2 mM myo-Inositol 2 % (w/v) Glucose Aminosäure-Supplementation 1,7 mM Leucin 0,4 mM Tryptophan 0,3 mM Histidin
Aminosäuremischung	20 g aller Standardamino-säuren, außer: Uracil, Leucin, Tryptophan und Histidin 2 g para-Aminobenzo-säure 5 g Adenin
YNB-Medium	0,15 % (w/v) Yeast Nitrogen Base 0,5 % (w/v) (NH ₄) ₂ SO ₄ nach Autoklavieren zugegeben 0,2 mM myo-Inositol 2 % (w/v) Glucose
LMF-Medium	10 % (v/v) Salz-Stammlösung 0,1 % (v/v) Spurenelemente-Stammlösung 0,1 % (v/v) Vitamin-Stammlösung 0,1 % (w/v) Aminosäuremischung 2 % (w/v) Glucose Aminosäure-Supplementation 1,7 mM Leucin 0,4 mM Tryptophan 0,3 mM Histidin

Salz-Stammlösung	5 % (w/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 % (w/v) KH_2PO_4 0,5 % (w/v) MgSO_4 0,1 % (w/v) NaCl 0,1 % (w/v) CaCl_2
Spurenelemente-Stammlösung	0,05 % (w/v) H_3BO_4 0,004 % (w/v) CuSO_4 0,01 % (w/v) KI 0,02 % (w/v) FeCl_3 0,04 % (w/v) MnSO_4 0,02 % (w/v) Na_2MoO_4 0,04 % (w/v) ZnSO_4
Vitamin-Stammlösung	0,0002 % (w/v) Biotin 0,04 % (w/v) Calcium Pantothenat 0,2 % (w/v) Inositol 0,04 % (w/v) Niacin 0,02 % (w/v) Para-amino Benzoat 0,04 % (w/v) Pyridoxin HCl 0,04 % (w/v) Thiamin HCl

4.11.1.3 Nährmedien für Caco-2 Zellen

Sowohl Anzucht als auch Passagieren erfolgt mit DMEM (*Invitrogen*). Vor der Verwendung wird das Medium mit hitzeinaktiviertem Kälberserum und Natriumpyruvat versetzt. Das Medium wird vor der Benutzung immer auf 37 °C erwärmt. Die Zugabe von Gentamycin erfolgte während der Kultivierung, um die Zellen vor Pilzbewuchs zu schützen. Beim Adhäsionstest an Epithelzellen darf jedoch kein Gentamycin vorhanden sein.

Tabelle 19: Nährmedium für Caco-2 Zellen.

Name	Zusammensetzung
DMEM	<i>Invitrogen</i> Supplementationen: 10 % FBS (Fetal Bovine Serum) 1 mM Na-Pyruvat (1 % Gentamycin)

4.11.2 Puffer

Nachfolgend sind die verwendeten Puffer und ihr Verwendungszweck aufgeführt.

Puffer für die Aufreinigung von DNA		
EB-Puffer	10 mM Tris/HCl	pH 8,0
L1-Puffer	25 mM Tris/HCl 10 mM EDTA 50 mM Glucose	pH 8,0
L2-Puffer	0,2 M NaOH 1 % (w/v) SDS	
L3-Puffer	5 M Kalium-Acetat 2 M Essigsäure	
PB-Puffer	Guanidiniumchlorid Isopropanol	
PE-Puffer	<i>Qiagen</i> 96-100 % Ethanol	
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl	pH 7,5

Puffer für die Agarosegel-Elektrophorese		
DNA-Probenpuffer	10 mM Tris/HCl 0,03 % (w/v) Bromphenolblau 0,03 % (w/v) Xylencyanol FF 0,15 % (w/v) Orange G 60 % (v/v) Glycerin 60 mM EDTA	pH 7,6
TAE-Puffer	40 mM Tris-Acetat 20 mM Na-Acetat 2 mM EDTA	pH 8,3

Puffer für die Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i>		
TFBI-Puffer	100 mM RbCl 50 mM MnCl ₂ 30 mM K-Acetat 10 mM CaCl ₂ 15 % (v/v) Glycerin	
TBFII-Puffer	10 mM MOPS 10 mM RbCl 75 mM CaCl ₂ 15 % Glycerin	

Puffer für die Herstellung kompetenter *S. cerevisiae* Zellen

SORB-Puffer	100 mM Li-Acetat 10 mM Tris 1 mM EDTA 1 M Sorbitol	pH 8,0
PEG-Puffer	100 mM Li-Acetat 19 mM Tris 1 mM EDTA 40 % (w/v) PEG 4000	pH 8,0

Puffer für die SDS-PAGE

Sammelgelpuffer	0,5 M Tris/HCl 8 mM EDTA 0,4 % (w/v) SDS	pH 6,8
Trenngelpuffer	1,5 M Tris/ HCl 8 mM EDTA 0,4 % (w/v) SDS	pH 8,8
SDS-Laufpuffer	25 mM Tris Base 192 mM Glycin 1 % (w/v) SDS	
SDS-Probenpuffer	65,2 mM Tris/HCl 15 % (v/v) Glycerin 4 % (w/v) SDS 1 Spatelspitze Bromphenolblau 4 % (v/v) β -Mercaptoethanol	pH 6,8
Färbelösung	0,25 % (w/v) Coomassie brilliant Blue 5 % (v/v) Essigsäure 50 % (v/v) Ethanol	
Entfärbelösung	5 % (v/v) Essigsäure 50 % (v/v) Isopropanol	

Puffer für die Proteinaufreinigung

AM-Puffer	200 mM NaCl 20 mM Tris/HCl	pH 8,0
AM-Elutionspuffer	200 mM NaCl 20 mM Tris/HCl 500 mM Imidazol	pH 8,0
AML	200 mM NaCl 20 mM Tris/HCl 50 mM Lactose	pH 8,0

AME	200 mM NaCl 20 mM Tris/HCl 10 mM EDTA	pH 8,0
-----	---	--------

Sonstige Puffer		
FS-Puffer	200 mM NaCl 20 mM Tris/HCl 5 mM CaCl ₂	pH 8,0
Carbonat-Puffer	0,1 M NaHCO ₃	pH 8,3
CFG-Puffer	200 mM NaCl 20 mM Tris/HCl 5 mM CaCl ₂ 1 mM EDTA	pH 8,0
MST-Puffer	200 mM NaCl 20 mM Tris/HCl 10 mM CaCl ₂ 0,05 % (v/v) Tween	pH 8,0
PBS-Puffer	0,14 NaCl 0,05 M KH ₂ PO ₄ 0,05 M Na ₂ HPO ₄	
PBS ⁻ -Puffer	0,14 M NaCl 2 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 2 mM KH ₂ PO ₄ 0,02 (w/v) EDTA	pH 7,4

4.11.3 Stammlösungen

Tabelle 20: Verwendete Stammlösungen mit Konzentrationsangabe.

Name	Konzentration
Kanamycin	35 mg/ml in H ₂ O
Spectiniomycin	12,5 mg/ml in H ₂ O
Ampicillin	100 mg/ml in H ₂ O
Lysozym	12 mg/ml H ₂ O
PMSF	1 M in Isopropanol
IPTG	1 M in H ₂ O
EDTA	0,5 M in H ₂ O pH 8,0
RNase	10 mg/ml H ₂ O
Lachssperma DNA	10 mg/ml in H ₂ O

5 Methoden

5.1 Molekularbiologische Methoden

5.1.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (*polymerase-chain-reaction*, PCR) wurde 1985 von Mullis *et al.* entwickelt. Mit Hilfe der PCR ist man in der Lage, DNA *in vitro* zu vervielfältigen, in der Regel bis zu einer Länge von 10 kb (Mullis & Faloona, 1987). Dabei wird ein Template-DNA-Strang, teilweise oder auch ganz, in einem zyklischen Prozess mit Hilfe von künstlich hergestellten Oligonukleotid-Primern und Desoxyribonucleinsäuren durch eine hitzestabile Polymerase vervielfältigt. Dazu ist theoretisch nur ein einziger Template-Strang nötig, was die Methode sehr effizient macht. Ein PCR-Zyklus unterteilt sich in folgende Schritte. Zuerst erfolgt die Denaturierung der doppelsträngigen Template-DNA bei hohen Temperaturen (Initialdenaturierung), wobei sich die DNA-Stränge trennen. Anschließend erfolgt bei reduzierter Temperatur das Anlagern der Primer an die einzelsträngige Template-DNA, das sogenannte Annealing. Die gewählte Annealingtemperatur ist sowohl Primer als auch Polymerase abhängig. Bei höheren Temperaturen bekommt man spezifischere PCR-Produkte, da eine falsche Anlagerung der Primer verhindert wird. Bei zu hoch gewählter Annealingtemperatur kann jedoch die Primeranlagerung verhindert werden, wodurch man kein PCR-Produkt erhält. Im anschließenden Elongationsschritt verlängert die Polymerase die Primer mit den in Lösung vorhandenen Nucleotiden. Die Extensionstemperatur wird dem Temperaturoptimum der verwendeten Polymerase angepasst. Die Elongationszeit richtet sich nach der Geschwindigkeit, in der die Polymerase die Basen verknüpft und der Länge des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts. Die Polymerase verknüpft immer in 5'-3'-Richtung. Die Menge an amplifizierter DNA wächst exponentiell mit 2^n (n = Zahl der Zyklen), da auch im Laufe der Zyklen immer mehr Template-DNA zur Verfügung steht. Oft erfolgt noch eine finale Extension, bei der alle unfertigen Extensionsschritte beendet werden. Zuletzt erfolgt Abkühlung und Lagerung bei 8 °C. Im Folgenden werden verschiedene angewandte PCR-Variationen beschrieben.

5.1.1.1 Einfügen von Restriktionsschnittstellen

Um ein DNA-Fragment gezielt aus einem Plasmid herauszuschneiden und anschließend mit einem anderen DNA-Fragment ligieren zu können, muss dies mit den passenden Schnittstellen flankiert sein. Solche Schnittstellen können durch eine PCR mit den passenden Primern, welche komplementär zu den Enden des Fragments sind und zusätzlich die Sequenz der gewünschten Schnittstelle tragen, angefügt werden. Es wurde die Phusion-Polymerase gewählt, die mit ihrer 3'-5'-Exonukleaseaktivität falsch eingebaute Nucleotide direkt nach ihrem Einbau entfernt und somit eine geringe Fehlerrate besitzt. Die Phusion-Polymerase ist in der Lage 1000 Basenpaare in 15-30 Sekunden zu verlängern. Dabei sollte die Annealingtemperatur um 3 °C höher als die niedrigste Schmelztemperatur der jeweiligen Primer gewählt werden. Alle *EPAA*-Domänen wurden gleichzeitig amplifiziert, weshalb zu Beginn eine hohe Annealingtemperatur eingestellt wurde, die jeden Zyklus um 0,2 °C erniedrigt wurde. Somit konnten alle PCR-Ansätze gleichzeitig in einem Zykler, aber getrennten Reaktionsgefäßen durchgeführt werden. Zusammensetzung und Temperaturprofil der verschiedenen PCR-Ansätze sind nachfolgend dargestellt.

Tabelle 21: PCR-Reaktionszusammensetzung.

Volumen / μl	Substanz
10 μl	5x HF-Puffer (Fermentas)
1 μl	dNTPs (10 mM)
1 μl	Fwd-Primer (20 pM)
1 μl	Rev-Primer (20 pM)
1,5 μl	DMSO (100 %)
1 μl	Template-DNA
1 μl	Phusion DNA-Polymerase
ad 50 μl	H ₂ O

Tabelle 22: PCR-Reaktionsbedingungen.

	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initial-Denaturierung	98 °C	30 sek	1
Denaturierung	98 °C	15 sek	35
Annealing	68-0,2 °C	30 sek	
Elongation	72 °C	30 sek	
Finale Elongation	72 °C	5 min	1

5.1.1.2 Sequenzspezifische Mutagenese (*quick-change mutagenese*)

Die Quickchange-PCR ist eine Methode, um gezielte Mutagenese wie Punktmutation, Deletion oder Insertion in einem Plasmid durchzuführen (Braman, *et al.*, 1996). Hierbei werden Primer mit der gewünschten Mutation eingesetzt, welche sich an die Plasmid-DNA lagern und verlängert werden, sodass über *Whole-Vector*-PCR ein neues Plasmid entsteht, welches die gewünschte Mutation trägt. Dabei ist wichtig, dass ein Ausgangsplasmid mit geringer Größe gewählt wird, sodass in der Elongation das ganze Plasmid leichter vervielfältigt werden kann. Bei dieser Methode ist es außerdem von Bedeutung, dass keine herkömmliche Polymerase wie Taq oder Pfu verwendet wird, sondern die Phusion DNA-Polymerase, welche DNA mit hoher Geschwindigkeit und einer minimalen Fehlerrate vervielfältigt. Es wurde zudem die Hot-Start-Methode verwendet, bei welcher die Polymerase erst nach der Initial-Denaturierung zum PCR Ansatz hinzugegeben wird, was den Vorteil hat, dass weniger Artefakte entstehen. Die geringe Zyklenzahl wurde auch aufgrund von Artefaktverminderung gewählt.

Tabelle 23: Reaktionszusammensetzung für *Quickchange*-PCR.

Volumen / μl	Substanz
10 μl	5x HF-Puffer (Fermentas)
1 μl	dNTPs (10 mM)
1 μl	Fwd-Primer (20 pM)
1 μl	Rev-Primer (20 pM)
1 μl	Template-DNA
1 μl	Phusion DNA-Polymerase
ad 50 μl	H ₂ O

Tabelle 24: Reaktionsbedingung für *Quickchange*-PCR.

	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initial-Denaturierung	98 °C	10 sek	1
Denaturierung	98 °C	30 sek	15
Annealing	55 °C	30 sek	
Elongation	72 °C	3 min	

Nach der PCR wurde noch ein *DpnI* Verdau mit dem Reaktionsansatz durchgeführt, bei dem lediglich die methylierte Template-DNA verdaut wird. Somit bleibt für die

nachfolgende Transformation nur noch das gewünschte Whole-Vector-PCR Produkt übrig.

5.1.1.3 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR ist eine einfache Methode, um den Erfolg einer Ligation zu überprüfen. Das Besondere an dieser Art von PCR ist, dass als Template eine *E. coli*-Kolonie verwendet wird, welche vor Beginn der PCR zum Ansatz gegeben wird. Durch Verwendung ausgewählter Primer ist man anschließend in der Lage zu überprüfen, ob das gewünschte Insert in das Plasmid eingebaut wurde. Die optimale Annealingtemperatur sollte 2 °C unter der niedrigsten Schmelztemperatur der gewählten Primer liegen.

Tabelle 25: Reaktionszusammensetzung für Kolonie-PCR.

Volumen / μl	Substanz
1 μl	Pfu-Puffer
0,25 μl	dNTPs (10 mM)
0,25 μl	Fwd-Primer (20 pM)
0,25 μl	Rev-Primer (20 pM)
1 μl	Taq-Pfu-Polymerase
ad 20 μl	H ₂ O

Tabelle 26: Reaktionsbedingung für Kolonie-PCR.

	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initial-Denaturierung	94 °C	5 min	1
Denaturierung	94 °C	30 sek	20
Annealing	64 °C	40 sek	
Elongation	72 °C	60 sek	
Finale Elongation	72 °C	10 min	1

5.1.2 Präparation von DNA nach der PCR

Zur Aufreinigung von PCR-Produkten wurde das QIAquick PCR Purification Kit (*Qiagen* GmbH) verwendet. Es beruht auf der Bindung von DNA an einer Silicamatrix bei hohen Salzkonzentrationen und einem pH-Wert $\leq 7,5$ mit nachfolgender Elution bei Niedrigsalzbedingungen und einem basischen pH-Wert (pH 8,5) (Birnboim & Doly, 1979, Vogelstein & Gillespie, 1979). Nukleotide und Primer sind zu klein um an der

Matrix zu binden, da erst ab einer Länge von mindestens 100 bp eine Adsorption an die Matrix gewährleistet ist. Zuerst wurde die PCR-Lösung mit dem fünffachen Volumen PBI-Puffer verdünnt. Aufgrund eines beigetzten Farbstoffes war die Lösung gelb, als Indikator für genügend saure Bedingungen, um eine optimale Bindung der DNA an die Säulenmatrix zu gewährleisten. Anschließend gab man die Lösung auf eine QIAquick Spinsäule, inkubierte 5 Minuten bei Raumtemperatur und zentrifugierte 1 Minute bei 13000 rpm. Der Durchfluss wurde erneut auf die Säule gegeben und zentrifugiert. Anschließend wurde der Durchfluss verworfen. Im nächsten Schritt wurde die Säule mit 750 µl PE-Puffer gewaschen und 1 Minute bei 13000 rpm zentrifugiert. Aufgrund des im PE-Puffer enthaltenen Ethanols wurden die restlichen auf der Säule verbliebenen Salze, die Polymerase, Nukleotide und andere Verunreinigungen von der Säule gewaschen. Danach wurde die Säule getrocknet und weitere 2 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert um sämtliches Ethanol zu entfernen, da dieses bei folgenden enzymatischen Reaktionen stören kann. Zur Elution der DNA wurden 30 µl EB-Puffer auf die Säule gegeben, 1 Minute inkubiert und anschließend 1 Minute bei 13000 rpm zentrifugiert

5.1.3 Agarosegelelektrophorese

Mit Hilfe von Agarosegelelektrophorese ist es möglich, die nach einer PCR oder einem Restriktionsverdau auftretenden Fragmente der Größe nach zu trennen. Ihre Größe kann mit einem DNA-Marker identifiziert werden. Zur Trennung verwendet man ein Agarosegel, welches je nach Agarosekonzentration unterschiedlich große Poren besitzt, durch welche sich die DNA bewegen kann. Die Auftrennung nach Größe erfolgt durch ein elektrisches Feld. Aufgrund der negativ geladenen Phosphatgruppen bewegt sich die DNA in Richtung Anode. Kleinere DNA-Fragmente können die Poren schneller passieren. Nach der Gelelektrophorese wird die DNA mit Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-Licht detektiert. Dies beruht auf der Interkalation der Ethidiumbromids mittels π -Stacking zwischen den aromatischen Basen. 1 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer wurde in der Mikrowelle aufgeköcht, bis alles gelöst war, bzw. bereits gelöste 1 %ige Agarose aus dem 60 °C Schrank entnommen und anschließend in einen Gelschlitten mit Kamm gegossen. Nach Aushärten des Agarosegels wurde der Gelschlitten in eine Gelelektrophoresekammer überführt, mit TAE-Puffer überschichtet und der Kamm entfernt. Die DNA-Proben wurden im Verhältnis 5:1 mit 6xDNA-Probenpuffer versetzt

und anschließend in die durch den Kamm entstandenen Taschen pipettiert. Nun wurde eine Spannung von 120 V angelegt. Die Gelelektrophorese wurde abgebrochen, wenn sich die Marker-Bande 1 bis 2 cm vor dem Ende des Gels befand. Danach erfolgte eine 5-minütige Inkubation des Gels in Ethidiumbromidlösung mit darauf folgender 5-minütiger Inkubation in Wasser. Die Detektion der Fluoreszenz erfolgte unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 254 nm mit einem GelDoc XR System und der Software Quantity One 1-D (*Bio-Rad*).

5.1.4 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Nach einer präparativen Gelelektrophorese wurde die gewünschte Bande unter möglichst kurzer UV-Bestrahlung ausgeschnitten, da UV-Licht die DNA schädigt. Zur Isolation der DNA aus dem erhaltenen Agarosestück wurde das QIAquick Gel Extraction Kit (*Qiagen GmbH*) verwendet. Dieses basiert, wie auch schon die Aufreinigung von PCR-Produkten, auf der Bindung von DNA an die Silicamatrix einer Säule bei Hochsalzbedingungen ($\text{pH} \leq 7,5$) (Vogelstein & Gillespie, 1979). Verunreinigungen passieren die Säule, und nach einem Waschschrift kann die DNA unter Niedrigsalzbedingungen bei einem basischerem pH eluiert werden. Zuerst wurden die ausgeschnittenen Gelstücke gewogen, mit dem dreifachen Volumen QG-Puffer ($1\text{mg} = 1\text{ml}$) versetzt und anschließend durch 10 minütiges Inkubieren bei 50°C gelöst. Durch den im QG-Puffer enthaltenen pH-Indikator konnte bei gelber Färbung erkannt werden, dass der $\text{pH} \leq 7,5$ liegt. Anschließend wurde die Lösung auf eine MinElute Säule (*Qiagen GmbH*) gegeben. Nach 1 minütiger Inkubation wurde 1 Minute bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Danach wurden $750\ \mu\text{l}$ PE-Puffer auf die Säule gegeben und nach 5 minütiger Inkubation 1 Minute bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Anschließend wurde die Säule getrocknet, in ein neues Reaktionsgefäß gesetzt und erneut zentrifugiert, um restliches Ethanol zu entfernen. Danach wurden $30 - 50\ \mu\text{l}$ EB-Puffer auf die Säulenmatrix gegeben, 1 Minute inkubiert und die DNA durch 1-minütige Zentrifugation bei 13000 rpm eluiert.

5.1.5 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration der DNA Lösungen wurde photometrisch ermittelt. Dafür wurde die Absorption der Probe bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Die Messung erfolgte mit Hilfe des ND-1000 Spectrophotometers (*Nanaodrop, Thermo Fisher*)

Scientific Inc.). Mittels folgender Gleichung ließ sich die DNA-Konzentration berechnen (Mülhardt, 2002):

$$cDNA = A260 \cdot 50ng \div \mu l$$

Mit dem Verhältnis A260/A280 kann man zudem Aussagen über die Verunreinigung der Probe mit Protein treffen. Für eine proteinfreie DNA-Lösung ist ein Wert von 1,8 – 2,0 typisch.

5.1.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation des Inserts mit dem Plasmid-Rückgrats wurde die T4-DNA-Ligase (*Roche GmbH*) verwendet. Sie katalysiert unter ATP-Verbrauch die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen 5'-Phosphat- und 3'-OH-Gruppe der doppelsträngigen DNA. Die DNA des Plasmid- Rückgrats und des Inserts wurden im Verhältnis 1:5 eingesetzt. Der folgende Ansatz wurde durch 2 stündige Inkubation bei Raumtemperatur ligiert.

Tabelle 27: Reaktionszusammensetzung für Ligation.

Volumen bzw. Stoffmenge	Substanz
100 fmol	Insert
20 fmol	Plasmid-Backbone
0,5 µl	T4-DNA-Ligase (400 U/µl)
2 µl	T4-DNA-Ligase-Puffer (10x)
ad 20 µl	H ₂ O

Im Falle der Ligation von PCR-Produkten mit glatten Enden in die Suizidvektoren pCR-Blunt II-TOPO und pJET1.2 wurden folgende Ansätze zusammen pipettiert und durch 2-stündige Inkubation bei Raumtemperatur miteinander ligiert.

Tabelle 28: Reaktionszusammensetzung für Ligation in Suizidvektor pJET1.2.

Volumen bzw. Stoffmenge	Substanz
10 µl	PCR-Produkt
2 µl	pJET1.2
0,5 µl	T4-DNA-Ligase (400 U/µl)
2 µl	T4-DNA-Ligase-Puffer (10x)
ad 20 µl	H ₂ O

Tabelle 29: Reaktionszusammensetzung für Ligation in Suizidvektor pCR-Blunt II-TOPO.

Volumen bzw. Stoffmenge	Substanz
10 µl	PCR-Produkt
2 µl	pCR-Blunt II-TOPO
0,5 µl	T4-DNA-Ligase (400 U/µl)
2 µl	T4-DNA-Ligase-Puffer (10x)
ad 20 µl	H ₂ O

Die Ligationsansätze konnten direkt im Anschluss entweder bei -20 °C gelagert oder direkt in *E. coli* DH5α- oder TOP10F'-Zellen transformiert werden.

5.1.7 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Zur Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen wurde zuerst eine geringe Menge eines Glycerinstocks mittels Dreistrichverfahren auf einer Agarplatte ausgestrichen und diese über Nacht bei 37 °C inkubiert. Von dieser Platte impfte man eine 4 ml LB-Übernachtskultur mit einer Kolonie an und inkubierte schüttelnd bei 37 °C über Nacht. Mittels dieser Übernachtskultur wurde eine 50 ml 2YT-Übertagkultur im Verhältnis 1:100 angeimpft und bei 37 °C schüttelnd zu einer optischen Dichte von etwa 0.6 wachsen gelassen. Anschließend wurde die Zellen 15 Minuten bei 4 °C und 4000 rpm pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 15 ml TBF-I-Puffer resuspendiert und 2 Stunden auf Eis inkubiert. Danach wurden 15 Minuten bei 4 °C und 4000 rpm zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in 2 ml TBF-II-Puffer resuspendiert und anschließend zu je 50 µl in steile 1,5 ml Eppendorf-Gefäße aliquotiert. Diese wurden direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Kompetenz und Reinheit wurden wie bei den elektrokompetenten Zellen überprüft.

5.1.8 Transformation chemisch kompetenter Zellen

Die sequenzierten Plasmide wurden sowohl zur DNA-Gewinnung als auch zur Herstellung der EpaA-Domänen exprimierenden *E. coli* Zellen in verschiedene chemisch kompetente *E. coli* Stämme transformiert. Bei dieser Methode wurde die Zellwand mittels Hitzeschock für die Plamid-DNA durchlässig gemacht. Dazu wurde ein Aliquot chemisch kompetenter Zellen (50 µl) langsam auf Eis aufgetaut. Danach gab man je nach Plasmid-Konzentration und zu transformierendem *E. coli* Stamm 0,2 – 10 µl Plasmid-DNA hinzu und ließ 30 Minuten auf Eis inkubieren. Anschließend

erfolgte ein Hitzeschock von 90 Sekunden bei 42 °C. Die Proben wurden direkt danach 60 Sekunden auf Eis gekühlt, bevor sie mit 950 µl warmem SOC-Medium versetzt wurde. Danach erfolgte schüttelnd eine einstündige Inkubation bei 37 °C. Darauffolgend wurden Zellen LB-Agar-Platten mit Hilfe von Glasperlen ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Abhängig von Plasmid und *E. coli* Stamm wurden die Agarplatten zur Selektion zuvor mit verschiedenen Antibiotika versetzt.

5.1.9 Präparation von Plasmid-DNA

Die Präparation von Plasmid-DNA mittels Anionentauscher-Säulen beruht auf der alkalischen Lyse der Zellen und anschließender Bindung von DNA-Strängen, die größer als 100 bp sind, an eine Silicamatrix unter Hochsalzbedingungen. Die Elution erfolgt unter Niedrigsalzbedingungen. Die Abtrennung von genomischer DNA der Zellen erfolgt nach einem modifizierten Protokoll von Birnboim und Doly, wobei genomische DNA unter alkalischen Bedingungen denaturiert, während Plasmid-DNA in Lösung bleibt (Birnboim & Doly, 1979). Zur Plasmidpräparation wurde das QIAprep Spin Miniprep Kit (*Qiagen GmbH*) verwendet. Zellen aus 6 ml Übernachtskultur wurden pelletiert (2 Minuten, 13000 rpm) und anschließend in 250 µl P1-Puffer resuspendiert. Durch Zugabe von 250 µl P2-Puffer setzt die alkalische Lyse ein. Während 5 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde zwischendurch vorsichtig invertiert. Durch anschließende Zugabe von 350 µl N3-Puffer wurde die Lösung neutralisiert. Bei 5 minütiger Inkubation auf Eis fielen Zellfragmente und genomische DNA als weißer Niederschlag aus, welcher im Anschluss durch Zentrifugation (10 Minuten, 13000 rpm) abgetrennt wurde. Der Überstand wurde dann auf ein QIAprep-spin-Säule gegeben, 5 Minuten inkubiert, bevor er 1 Minute bei 13000 rpm zentrifugiert wurde. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule mit 750 µl PE Puffer gewaschen (1 Minute, 13000 rpm). Anschließend wurde die Säule getrocknet, in ein neues Eppendorfgefäß gesetzt und erneut zentrifugiert, um restliches Ethanol zu entfernen. Danach wurden 50 µl EB-Puffer (42 °C) auf die Säule gegeben, 5 Minuten inkubiert und anschließend die DNA unter Niedrigsalzbedingungen durch Zentrifugation von der Säule eluiert (2 Minuten, 13000 rpm).

5.1.10 Präparation von Plasmid-DNA per Alkoholpräzipitation

Die Aufreinigung mittels Alkoholpräzipitation wird alternativ zur Präparation von Plasmid-DNA mittels Anionentauscher-Säulen verwendet. Da sie ohne Säulen

auskommt, kann man sie in größerem Maßstab anwenden, jedoch liefert sie nur mäßig gereinigte DNA. Die Abtrennung genomischer DNA erfolgte, wie oben, nach einer modifizierten Methode von Birnboim und Doly, beschrieben. Es wurden zunächst 2 ml der Übernachtskultur in ein Eppendorfgefäß überführt und bei 13000 rpm für 2 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µl L1-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden 200 µl L2 Puffer hinzugefügt und durch Invertieren des Eppendorfgefäßes gemischt. Das im Puffer enthaltene SDS löst nicht-kovalente Bindungen zwischen Proteinen und führt letztendlich zur Lyse der Zellmembran, sodass der Zellinhalt freigesetzt wurde. Durch NaOH im L2-Puffer wurde ein alkalisches Milieu eingestellt, was unter Auflösung von Wasserstoffbrückenbindungen zur Denaturierung von chromosomaler und Plasmid-DNA führte. Die Zugabe von 150 µl L3-Puffer gewährleistete danach die Neutralisation. Nach erneutem Invertieren fielen so Zellfragmente, denaturierte Proteine und genomische DNA als weißer Niederschlag aus. Die Lösung wurde für 5 Minuten auf Eis inkubiert und danach 10 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Die Plasmid-DNA konnte renaturieren und befand sich im Überstand. 350 µl des Überstandes wurden dann in ein neues 1,5 ml-Eppendorfgefäß überführt, mit 700 µl eiskaltem Ethanol (100%) gemischt und für 10 Minuten bei -20 °C inkubiert. Ethanol macht die Plasmid-DNA schwer wasserlöslich, sodass diese im Anschluss durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 13000 rpm und 4 °C pelletiert werden konnte. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet getrocknet und in 20 µl dH₂O mit RNaseA gelöst.

5.1.11 Analytischer und präparativer Restriktionsverdau von DNA

Die durch Restriktionsendonucleasen katalysierte hydrolytische Spaltung von DNA (Restriktionsverdau) kann zu analytischen und präparativen Zwecken verwendet werden. Die hier verwendeten Typ-II-Endonucleasen erkennen und spalten die DNA an bestimmten, meist palindromischen Sequenzen. Alle verwendeten Endonucleasen erzeugten, mit Ausnahme von *EcoRV*, überhängende Enden (*sticky ends*). Die Restriktionsreaktionen wurden nach den Angaben des Enzymherstellers (*Fermentas*) mit den entsprechenden Puffern angesetzt und durchgeführt. Im präparativen Verdau wurde eine größere Menge DNA geschnitten, sodass die Vektor- oder Insert-DNA für Klonierungen verwendet werden konnte. Im analytischen Verdau wurde eine kleinere

Menge DNA geschnitten, um anhand des resultierenden Bandenmusters zu beurteilen, ob die eine vorherige Ligation funktioniert hat.

Tabelle 30: Reaktionszusammensetzung von Restriktionsverdauen.

analytischer Verdau	Substanz	präparativer Verdau
1 µl	Puffer 10x konzentriert	6 µl
0,1 µl	Enzym 1	2 µl
0,1 µl	Enzym 2	2 µl
1 µl	Plasmid-DNA	40-50 µl
ad 10 µl	H ₂ O	ad 60 µl

Sowohl der analytische als auch der präparative Restriktionsverdau wurde anschließend bei 37 °C inkubiert. Der analytische für 1 – 2 Stunden, der präparative hingegen 4 Stunden und zum Teil auch über Nacht, da hierbei das Plasmid möglichst vollständig geschnitten sein sollte, um die größte Menge des gewünschten Fragments zu erhalten. Zum Teil ist es sinnvoll, die Restriktionsenzyme nach der Reaktion mittels Hitze zu inaktivieren. Besitzen die Enzyme jedoch keine Star-Aktivität, und wird der Verdau direkt weiter verarbeitet, kann dieser Schritt auch ausgelassen werden.

5.1.12 Kultivierung von *E. coli*

E. coli Zellen wurden in LB-Medium auf einem Rotationsschüttler über Nacht inkubiert. Zur Selektion auf Plasmide wurde Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml, Kanamycin mit 35 µg/ml oder Spectinomycin mit 12,5 µg/ml zugegeben. Festmedien enthielten zusätzlich 2 % (w/v) Agar. Durch Messung der optischen Dichte bei 595 nm mit Hilfe eines Photometers wurde das Wachstum der *E. coli*-Kulturen bestimmt. Eine OD₆₀₀=1 entspricht dabei einer Zelldichte von $2 \cdot 10^8$ Zellen/ml (Sherman, 1986).

5.1.13 Stammhaltung

500 µl einer Übernachtskultur wurden mit 1 ml Glycerin (87 %) gemischt und direkt danach in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Mit Hilfe der Glycerinstocks kann Plasmid-DNA gesichert und gelagert werden. Zudem kann jederzeit genügend neue Plasmid-DNA angezogen werden. Des Weiteren können die Plasmid-tragenden Expressionsstämme auch mittels Glycerinstock über Nacht angeimpft werden, sodass nicht immer frisch transformiert werden muss. Die Bakterien

befinden sich bei diesem Verfahren in der Wachstumsphase und sind beim Einsatz des Stocks direkt zur Zellteilung bereit.

5.1.14 Klonierung von *EPA*-Genen in *E. coli* Expressionsvektoren

Die Gene der verschiedenen EpaA-Domänen wurden mittels der in Tabelle 9 beschriebenen Primer über PCR amplifiziert. Dabei diente die genomische DNA des *C. glabrata* Stammes CBS138 als Vorlage. Die Fragmente wurden anschließend in die Suizidvektoren pJet1.2 oder pCR-Blunt II-TOPO ligiert und in chemisch kompetente *E. coli TOP10* Zellen transformiert. Nach Überprüfung der einzelnen Klone mittels analytischem Testverdau und Sequenzierung wurden die verschiedenen *EPAA*-Domänen über die zuvor während der PCR eingeführten Restriktionsstellen *NdeI* und *XhoI* sowie *NheI* und *XhoI* aus dem Vektor geschnitten. Nach dem präparativen Restriktionsverdau und darauf folgender, präparativer Agarosegelelektrophorese wurden die Inserts der verschiedenen *EPAA*-Domänen aus dem Agarosegel extrahiert und anschließend mit Hilfe eines Gel-Extraktions-Kit (*Qiagen*) gereinigt. Mit dem leeren *E. coli* Expressionsvektor pET28a wurde, nach zuvor erfolgtem Verdau mittels der beiden Kombinationen an Restriktionsendonukleasen *NdeI* und *XhoI* sowie *NheI* und *XhoI*, ebenso verfahren. Die erhaltenen Insert-Fragmente wurden anschließend mit dem geöffneten Expressionsvektor ligiert und erneut in chemisch kompetente *E. coli TOP10* Zellen transformiert. Um die Richtigkeit der Subklonierung zu überprüfen, wurde mit einzelnen Klonen ein analytischer Verdau durchgeführt. Konstrukte mit erwartetem Schnittmuster wurden anschließend sequenziert (*Qiagen*), um sicher zu stellen, dass die A-Domänen der epithelialen Adhäsine im pET28a-Vektor erfolgreich hergestellt werden können. Durch Integration der *EPAA*-Domänen in den pET28a-Vektor über die Restriktionsstellen *NdeI* und *XhoI* bzw. *NheI* und *XhoI* wurden die EpaA-Domänen mit einem N-terminalen His₆-Tag fusioniert.

Tabelle 31: Übersicht der *in vitro* untersuchten EpaA-Domänen.

Konstrukt-name	Stammsammlungs-nummer	Aminosäuren	Molare Masse mit His ₆ -Tag	Extinktionskoeffizient
Epa1A	BHUM1829	T31 - S271	29401.6 Da	41175
Epa2A	BHUM2329	S34 - I256	27510.6 Da	32695
Epa3A	BHUM1788	K28 - R226	29095.6 Da	38655
Epa6A	BHUM1790	K26 - S271	29909.0 Da	48165
Epa7A	BHUM1792	K26 - S271	30078.2 Da	49655
Ep8A	BHUM2331	S36 - I259	27850.2 Da	32235

Epa9A	BHUM1886	D39 - D305	33203.5 Da	54125
Epa10A	BHUM2495	D39 - D306	32951.1 Da	49655
Epa11A	BHUM2332	S33 - I254	26818.2 Da	32235
Epa12A	BHUM1873	L26 - E292	32995.5 Da	43695
Epa13A	BHUM1874	D30 - I252	27268.0 Da	33725
Epa15A	BHUM2337	D41 - I265	28089.7 Da	42665
Epa19A	BHUM2339	S34 - V256	27463.7 Da	34185
Epa20A	BHUM2341	S33 - V279	30820.5 Da	46675
Epa21A	BHUM2343	T31 - I255	27746.1 Da	57340
Epa22A	BHUM2496	K28 - K266	28959.6 Da	37165
Epa23A	BHUM1876	I22 - G279	31765.2 Da	41175
Epa1A ^{CBL2Epa9}	BHUM2498	T31 - S271	29409.6 Da	41175
Epa2A ^{CBL2Epa1}	BHUM2500	P32 - C262	29245.7 Da	39770
Epa2A ^{CBL2Epa3}	BHUM2502	P32 - C262	29181.7 Da	38655
Epa3A ^{CBL2Epa1}	BHUM2504	K28 - R226	29245.7 Da	39770
Epa3A ^{CBL2Epa2}	BHUM2506	K28 - R226	29181.7 Da	38655
Epa6A ^{CBL2Epa1}	BHUM2508	K26 - S271	29972.1 Da	49655
Epa9A ^{CBL2Epa1}	BHUM2510	D39 - D305	33195.5 Da	54125

5.2 Proteinchemische Methoden

5.2.1 Heterologe Produktion von Proteinen im analytischen Maßstab

Proteinproduktion im analytischen Maßstab, auch als Testexpressionen bezeichnet, dient der Überprüfung des Expressionsverhaltens neu klonierter Gene sowie dem Löslichkeitsverhalten der produzierten Proteine. Nachfolgende präparative Expressionen sollten den Testexpressionen in allen Bedingungen entsprechen. Die Testexpressionen wurden in 250 ml Erlenmeyerkolben mit jeweils 50 ml Medium durchgeführt. Sie wurden im Verhältnis 1:100 aus Übernachtskulturen angeimpft. Kanamycin wurde im Verhältnis 1:1000 als Selektionsmarker zugefügt. Aufgrund vorheriger Arbeiten wurde lediglich der *E. coli* Stamm SHuffle T7 Express als Expressionsstamm verwendet. Auch die Temperatur und Dauer der Expression wurden aufgrund der hohen Anzahl an Konstrukten an vorherigen Ergebnisse angeglichen (12 °C, 72 h). Variiert wurden das Medium (LB- und TB-Medium) sowie verschiedene IPTG-Konzentration (0 mM, 0,01 mM, 0,05 mM und 0,1 mM) (Abbildung 59).

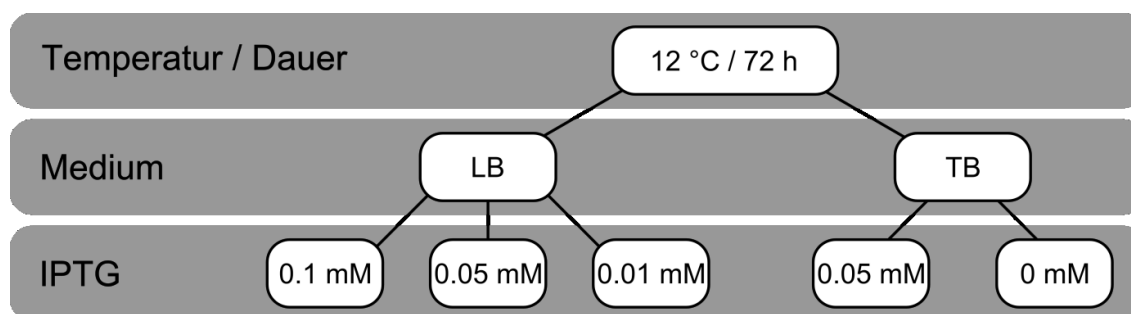


Abbildung 59: Getestete Expressionsbedingungen.

Schematische Darstellung der durchgeführten Testexpressionen. Pro Protein wurden 5 verschiedene Bedingungen getestet. Der *E. coli* Stamm SHuffle T7 Express diente als Expressionsstamm.

Am besten geeignet erwies sich die Expressionbedingung bei 12 °C für 72 h in LB-Medium und einer Induktion mit 0,05 mM IPTG, mit welcher im Anschluss die Expression im präparativen Maßstab durchgeführt wurde. Jedoch wurden einige Epa-Proteine trotz Expression unterschiedlicher Konstruktängen nur in geringeren Mengen hergestellt,

5.2.2 Analytischer Zellaufschluss

Trägt man eine SDS-Probe der Testexpression auf, kann man feststellen, ob das gewünschte Protein produziert wurde. Um festzustellen, ob es auch in löslicher Form vorliegt, muss zudem ein analytischer Zellaufschluss durchgeführt werden. Dazu wurde das Zellpellet in 1 ml AM-Puffer resuspendiert. Um Serin-, beziehungsweise Metallo-Proteasen zu inhibieren und den Zellaufschluss zu erleichtern, wurden noch 1 µl EDTA (0.5 M), 0,5 µl PMSF (0,2 M) und 10 µl (12 mg/ml) Lysozym hinzugefügt, bevor die Zellsuspension 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Anschließend wurde die Probe auf Eis gelagert, bevor sie mittels Ultraschall aufgeschlossen wurde. Dazu wurde die Probe auf Eis mit 3 x 20 Ultraschallpulsen (40 ms, Programm72D) behandelt. Nach dem Aufschluss wurden die unlöslichen Zellbestandteile 30 Minuten bei 4 °C und 13000 rpm pelletiert und von dem Löslichen getrennt. Es wurde von beiden Teilen Gelproben genommen (50 µl Überstand + 50 µl SDS-Probenpuffer; 50-µl Pellet resuspendiert in 500 µl AM-Puffer + 50 µl SDS-Probenpuffer).

5.2.3 Heterologe Produktion von Protein im präparativen Maßstab

Anhand der mittels Testexpression gewonnenen Informationen wurde die heterologe Überexpression der verschiedenen EpaA-Domänen im *E. coli* Stamm

SHuffle T7 Express durchgeführt. Mit Hilfe der Glycerinstocks wurde eine 50 ml Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C schüttelnd inkubiert. In 5 l Schikanekolben wurden 2 l LB-Medium im Verhältnis 1:100 mit der Übernachtskultur angeimpft. Kanamycin (35 mg/ml) wurde als Resistenzmarker im Verhältnis 1:1000 hinzugefügt. Anschließend wurden die Kulturen bei 37 °C und 110 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von etwa 0.2 – 0.3 inkubiert. Danach erfolgte Verringerung der Temperatur auf 12 °C. Beim Erreichen einer OD₆₀₀ von etwa 0.6 – 0.8 wurden 0,05 mM IPTG zur Induktion der Proteinproduktion hinzugegeben und anschließend 72 Stunden bei 12 °C und 110 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in JA10-Bechern geerntet (15 Minuten, 6000 rpm, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet aus 2 Litern in 15 ml AM-Puffer resuspendiert, in ein Falcontube überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

5.2.4 Präparativer Zellaufschluss

Der Zellaufschluss der präparativen Expression wurde mit einem Hochdruckhomogenisator (*French Press*) durchgeführt. Das Gerät schließt die Zellen durch hohe Scherkräfte auf, die durch hohen Druck und schlagartige Entspannung in der Apparatur entstehen.

Vor dem Aufschluss mittels *French Press* wurden 25 ml Zellsuspension auf Eis aufgetaut, mit 10 µl EDTA (0,5 M), 10 µl PMSF (0,2 M), 50 µl Lysozym (50 mg/ml) und einer Spatelspitze DNaseI versetzt. Nach 15 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Suspension in die eisgekühlte Hochdruckzelle gegeben und die Zellen bei einem Druck von etwa 1000 psi aufgeschlossen. Nach dem Aufschluss wurden die unlöslichen Fragmente durch 30-minütiger Zentrifugation in JA20-Bechern bei 4 °C und 23000 rpm abgetrennt. Das Pellet wurde verworfen, der Überstand anschließend steril filtriert, in ein separates Falcontube überführt und bis zum ersten Aufreinigungsschritt mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie auf Eis gelagert.

5.2.5 Aufreinigung der Proteine mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie

Die Ni-NTA-Affinitätschromatographie eignet sich zur Aufreinigung von Proteinen, welche bindende Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial eingehen. 1975 wurde von Porath eine Möglichkeit vorgestellt, Proteine über Chelatisierung von Metallen durch bestimmte Aminosäuren an eine Gelmatrix zu binden (Porath, *et al.*, 1975). Die

verwendete Methode beruht auf der Chelatisierung von Ni^{2+} -Atomen durch Histidinketten des Proteins. Dabei handelt es sich um einen zuvor mit dem Protein fusionierten Hexa-Histidin-tag. Der Tag chelatisiert Nickel, welches über einen Komplex mit Nitrilelessigsäure (NTA) an eine Gelmatrix aus Sepharose CL-6B (*Qiagen*) gebunden ist (Abbildung 60). Auf diese Weise kann ein Protein, das einen His₆-Tag enthält, an die Säule adsorbieren, während unerwünschte Proteine und weitere Verunreinigungen die Säule passieren. Das Protein kann mit Hilfe eines imidazolhaltigen Puffers eluiert werden, welches ebenfalls Nickel bindet, und ab einer bestimmten Konzentration die Histidin-Seitenkette kompetitiv verdrängt.

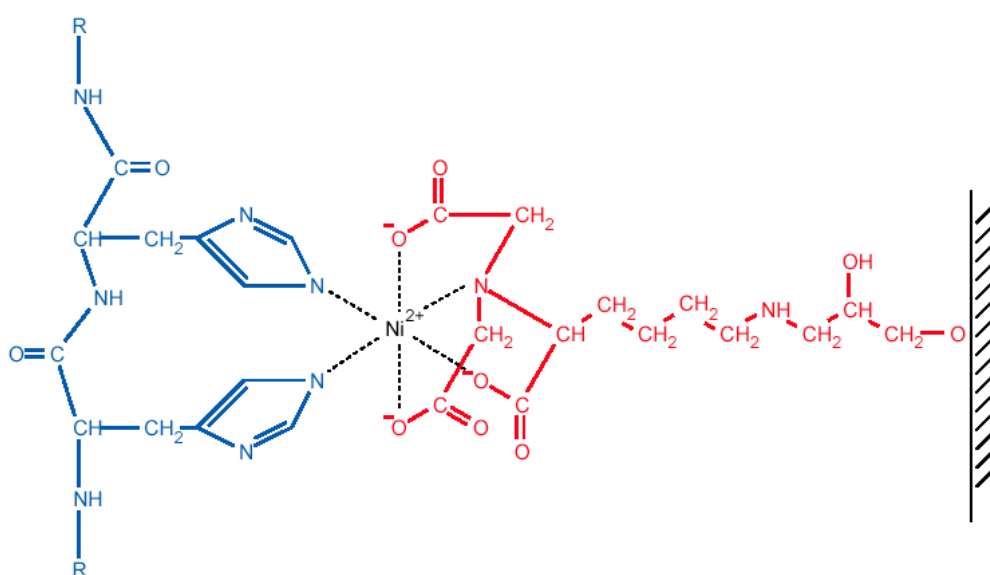


Abbildung 60: Bindung eines Proteins mit His₆-Tag an den Ni-NTA-Komplex.

Das Protein ist in blau und die Nitrilelessigsäure in rot dargestellt (Qiagen, 2003).

Das Säulenbettvolumen der verwendeten Säule betrug etwa 6 ml und bestand aus Ni-NTA-High-Performace Material (*GE Healthcare*). Der nach dem Zellaufschluss in AM-Puffer aufgenommene lösliche Proteinanteil wurde mit Hilfe der Peristaltikpumpe und einer Flussrate von 2 ml/min auf die Säule aufgetragen. Anschließend wurde solange mit 5 % AM-Puffer gewaschen, bis kein Protein mehr von der Säule eluiert wurde. Danach wurde ein Stufengradient mit steigender Imidazolkonzentration gefahren (5, 7,5, 10, 15, 20, 30, 30 - 100 % des AM-Puffers mit 500 mM Imidazol). Mit Hilfe eines Fraktionskollektors wurden 12 ml-Fraktionen gesammelt. Um die Säule nach Elution des gewünschten Proteins zu reinigen, wurden weiter 15 ml des imidazolhaltigen Puffers über die Säule gespült. Zur Entfernung des Imidazols wurde mit dem dreifachen Säulenvolumen an AM-Puffer gespült. Nach Benutzung der Säule wurde diese zunächst

mit dem dreifachen Säulenvolumen Wasser und anschließend mit 20 % Ethanol gewaschen und gelagert.

5.2.6 Aufreinigung der Proteine mittels Größenaufschlusschromatographie

1959 wurde das erste Mal die Gelfiltrationschromatographie von Porath beschrieben (Porath & Flodin, 1959). Mit dieser Methode können Proteine über ihre Größe aufgetrennt werden, wodurch Verunreinigungen und nicht assembliertes Protein abgetrennt werden können. Bei diesem Aufreinigungsschritt werden die Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt. Dies gelingt durch die Verwendung von porösem Säulenmaterial. Sehr große Proteine, die nicht in die Poren der Matrix hineinwandern können, eluieren im Ausschlussvolumen der Säule. Kleine Proteine können in die Poren diffundieren, somit steht ihnen ein größeres Säulenvolumen zur Verfügung, weshalb sie die Säule langsamer passieren. Des Weiteren spielt die Gestalt der Proteine eine Rolle. Von zwei Proteinen gleicher Masse eluieren die globulären später von der Säule als die weniger globulären. Da ein linearer Zusammenhang zwischen dem Elutionsvolumen dem dekadischen Logarithmus des Molekulargewichts der Proteine besteht, kann aus dem Elutionsvolumen die ungefähre Masse abgeschätzt werden. Verwendet wurde die HiLoad Superdex 75 PG Säule (*GE Healthcare*) mit einem Säulenbettvolumen von 120 ml. Die Säule wurde unter 20 % Ethanol gelagert, mit drei Volumina Wasser gewaschen und dann mit drei Säulenvolumina des gewünschten Puffers äquilibriert. Nun kann der Auftrag der Proteinlösung im Verhältnis 1:100 zum Volumen des Säulenbettes erfolgen. Eluiert wurde mit einer Flussrate von 1 ml/min, wobei 1,5 ml Fraktionen gesammelt wurden.

5.2.7 Präparative heterologe Überexpression und Aufreinigung der EpaA-Domänen

Die präparative Expression der verschiedenen EpaA-Domänen wurde unter der zuvor ausgewählten Bedingung, jedoch im 2 l Maßstab, durchgeführt. Nach Aufschluss der Zellpellets mittels *French-Press* und Klärung des Lysats durch Ultrazentrifugation und Sterilfiltration war der erste chromatographische Schritt die Aufreinigung mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie. Nach Auftragen des Überstands auf die Säule wurde diese anschließend mit einer Imidazolkonzentration von 25 mM im Puffer gewaschen, um unspezifisch gebundenes Protein von der Säule zu entfernen. Danach erfolgte eine stufenweise Elution mit verschiedenen Imidazolkonzentrationen

(Abbildung 61). Wie auf dem SDS-PAGE-Gel zu sehen ist, lieferte die Ni-NTA-Affinitätschromatographie zum Teil schon Protein mit hoher Reinheit. Dies traf jedoch nicht für die EpaA-Domänen zu, die in geringen Mengen exprimiert wurden.

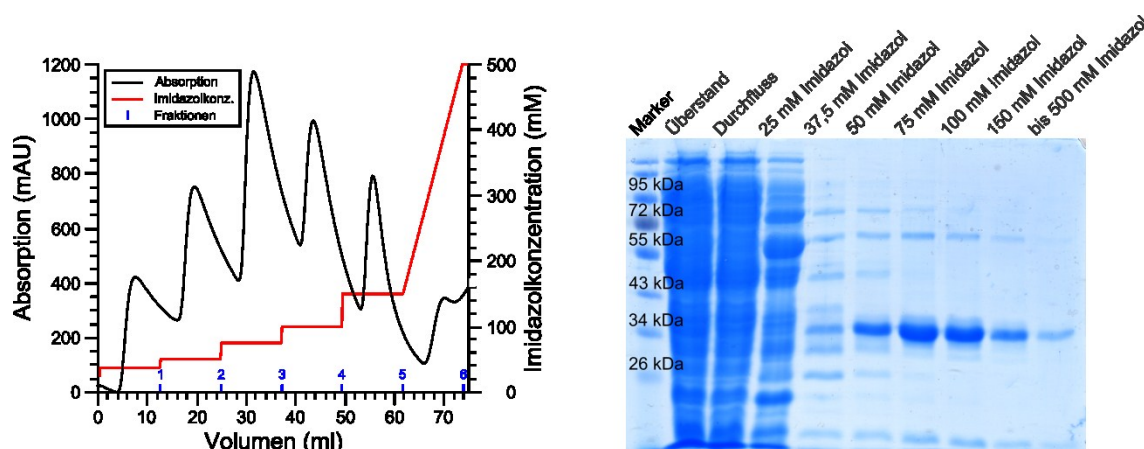


Abbildung 61: Chromatogramm und SDS-PAGE der Ni-NTA-Affinitätschromatographie.

Repräsentatives Chromatogramm und reduzierende SDS-PAGE der präparativen Aufreinigung mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie. Bei einer Imidazolkonzentration von 75 mM konnten die verschiedenen EpaA-Domänen annähernd in reiner Form erhalten werden.

Um die Proteine in hochreiner und monodispersen Form zu erhalten, erfolgte anschließend ein zweiter Aufreinigungsschritt mittels Größenausschlusschromatographie. Dabei wurde eine HiLoad 16/600 Superdex 75 pg Säule (*GE Healthcare*) mit einem Säulenbettvolumen von 120 ml verwendet (Abbildung 62).

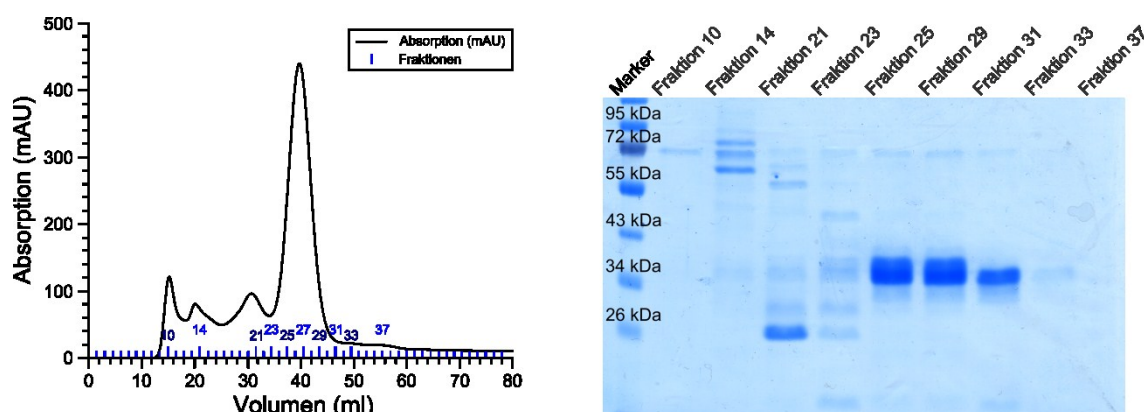


Abbildung 62: Chromatogramm und SDS-PAGE der Größenausschlusschromatographie.

Repräsentatives Chromatogramm und reduzierende SDS-PAGE der präparativen Aufreinigung mittels Größenausschlusschromatographie. Nach der Größenausschlusschromatographie wurden nur die Fraktionen mit dem gewünschten Protein in reiner Form vereinigt (Fraktion 25 bis 33).

Durch Zugabe eines Glykans wie Lactose kann die Bindungstasche der Epa-Proteine zum Teil abgesättigt werden, sodass die Interaktion mit dem Säulenmaterial geringer

wird. Da es sich bei den Epa-Adhäsinen um calciumabhängige Lektine handelt, kann die Interaktion mit dem Säulenmaterial auch durch Zugabe von EDTA inhibiert werden. Da jedoch einige der EpaA-Domänen (Epa2A, Epa3A, Epa9A, Epa15A, Epa19A, Epa23A) durch Zugabe von EDTA deutlich instabiler wurden und dadurch die Vergleichbarkeit der Versuche beeinträchtigt gewesen wäre, wurden alle Proteine unter Anwesenheit von Lactose gereinigt.

5.2.8 Konzentration von Proteinen mittels Ultrafiltration

Die Erhöhung der Konzentration, bzw. die Verringerung des Volumens einer Proteinlösung erfolgte durch Ultrazentrifugation mit Amicon-Ultra-Konzentratoren (*Millipore Merck KGaA*, Darmstadt, D). Diese Konzentratoren bestehen aus einer Membran, deren Poren eine definierte Größe besitzen. Dadurch können nur Teilchen einer bestimmten Größe die Membran passieren, wobei das gewünschte Protein festgehalten wird. Die verwendeten Konzentratoren besaßen eine Ausschlussgröße von 10 kDa und ein Volumen von 15 oder 4 ml. Zum aufkonzentrieren wurde mehrmals 5 Minuten bei 4 °C und 4000 rpm zentrifugiert. Zwischen den Zentrifugationsschritten musste die Lösung mit Hilfe einer Pipette durchmischt werden, um das Denaturieren der am Boden des Konzentrators konzentrierteren Proteinlösung zu vermeiden.

5.2.9 Umpuffern der Proteinlösungen mittels Ultrafiltration

Für verschiedene nachfolgende Experimente müssen die Proteine in einem bestimmten Puffer vorliegen, der nicht zwingend dem Aufreinigungs-Puffer entspricht. Zum Umpuffern wurden ebenfalls die bereits erwähnten Konzentratoren angewandt, da die Proteine beim Pufferwechsel mittels PD10-Säule (*GE Healthcare*) mit dem Säulenmaterial interagieren und zum Teil so auf der Säule verbleiben. Bei der gewählten Variante wird die Proteinlösung auf mindestens 500 µl eingengt, in 15 ml Zielpuffer aufgenommen und wieder auf 500 µl eingengt, was mindestens dreimal wiederholt wurde. Mit Hilfe der Konzentratoren können fluoreszenzmarkierte Proteine auch von überflüssigem Farbstoff befreit werden.

5.3 Analytische Methoden

5.3.1 SDS-PAGE

Mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli ist es möglich, Proteinen entsprechend ihres Molekulargewichts aufzutrennen (Laemmli, 1970). Somit können Aussagen über Größe, Menge und Reinheit des Proteins getroffen werden. Um Effekte der Proteinstruktur auszuschließen, die eine Auswirkung auf die Mobilität der Proteine während der Elektrophorese haben können, erfolgt vor der Durchführung die vollständige Denaturierung. Die Denaturierung erfolgt durch das anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS), das Reduktionsmittel β -Mercaptoethanol und durch eine hohe Temperatur von 95 °C. Durch die negative Ladung des SDS wird die natürliche Ladung der Aminosäurekette abgeschirmt, wodurch bei allen vorhandenen Proteinen ein ähnliches Masse-Ladungsverhältnis hergestellt wird. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes werden die Proteine nach diesem Verhältnis aufgetrennt. Es besteht eine logarithmische Beziehung zwischen Molekulargewicht und Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine, das Proteingewicht kann mit Hilfe eines Molekulargewichtsstandard abgeschätzt werden. Über den Acrylamidgehalt im Gel kann die Trennleistung bestimmt werden. Höherprozentige Gele ($\geq 15\%$) dienen zum Trennen kleiner Proteine (< 20 kDa), wohingegen niedrigprozentige Gele ($\geq 10\%$) größere Proteine (> 66 kDa) besser trennen.

Die SDS-PAGE erfolgte in einer mit Elektrophoresepuffer gefüllten Mini Protean 3 Apparatur (*Biorad*). Es wurden selbst hergestellte 12 %ige SDS-Gele verwendet. Als Katalysator wurde TEMED eingesetzt. Der Start der Radikalreaktion wurde durch APS induziert. Die Rezeptur für zwei Gele ist wie folgt:

Tabelle 32: Reaktionszusammensetzung für 12 %ige SDS-Gele.

Sammelgel	12 % SDS-Gel	Trenngel
3,9 ml	H ₂ O	3,5 ml
1,5 ml	Sammelgelpuffer	---
---	Trenngelpuffer	2,5 ml
0,6 ml	Acrylamid (30 %)	4,0 ml
40 μ l	TEMED	25 μ l
20 μ l	APS (10 %)	15 μ l

Für die Analyse von analytischen Expressionen wurden von Pellet und Überstand je 50 µl mit 50 µl SDS-Probenpuffer versetzt und diese Mischung 5 Minuten bei 95 °C denaturiert. Davon wurden dann 10 µl in eine von zehn vorhandenen Geltaschen pipettiert. Um den Aufreinigungserfolg mittels Flüssigchromatografie zu zeigen, wurden 10 µl Probe mit 10 µl SDS Probenpuffer versetzt und davon 10 - 15 µl aufgetragen. Als Größenstandard wurde Pageruler™ Prestained Protein Ladder (*Fermentas*) verwendet. Die Elektrophorese wurde mit einer Spannung von 150 V gestartet. Wenn die Lauffront das Trenngel erreichte, wurde eine Spannung von 200 V eingestellt (Stromstärke 30 mA; Leistung 6 W). Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Sammelgel abgetrennt, das Trenngel in die Färberlösung gegeben, kurz in der Mikrowelle erhitzt und danach etwa 30 Minuten bei Raumtemperatur geschwenkt. Anschließend wurde es mit Wasser abgewaschen, in Entfärberlösung gegeben, kurz in der Mikrowelle erhitzt und ebenfalls geschwenkt. Der Vorgang des Entfärbens wurde beliebig oft wiederholt (Bennett & Scott, 1971). Die Gele konnten mit Hilfe eines Scanners dokumentiert werden.

5.3.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen wurde durch Detektion der Lichtabsorption bei einer Wellenlänge von 280 nm durchgeführt. Die beobachtete Absorption ist auf die in Proteinen enthaltenen aromatischen Aminosäuren, insbesondere Tyrosin und Tryptophan und auf die als Disulfidbrücken vorliegende Cysteine zurück zu führen. Daher ist es möglich, einen molaren Extinktionskoeffizienten aus der Primärsequenz eines Proteins zu berechnen. Die Berechnung der untersuchten Proteine in Wasser wurde mit Hilfe des *Expasy*-Servers vorgenommen. Da die Puffer, in welchen die Proteine vorlagen, nur geringe Salzkonzentrationen enthielten, konnte der berechnete Absorptionskoeffizient in guter Näherung verwendet werden. Die Proteinkonzentration ließ sich mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes bestimmen (Gill & von Hippel, 1989, Wilkins, *et al.*, 1999). Die Messung erfolgte mit Hilfe des ND-1000 Spectrophotometers.

$$E = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

$$E = \varepsilon \frac{m}{(V \cdot M)} d = \varepsilon \cdot c_m \frac{d}{m}$$

$$c_m = E \cdot \frac{M}{(\varepsilon \cdot d)}$$

E: Extinktion, ε : molarer Extinktionskoeffizient, m: Masse,
 c: Stoffmengenkonzentration, d: Schichtdicke, V: Volumen, M: Molekulargewicht,
 c_m : Massenkonzentration

5.3.3 Proteinmassenspektrometrie

Zur Identifikation von Proteinen und Proteinfragmenten wurden von Herrn Dr. Uwe Linne ESI-QTOF-Massenspektren aufgenommen. Zur zweifelsfreien Identifizierung der Proteine wurde eine *fingerprint*-Messung durchgeführt. Dazu wurden die zu untersuchenden Proteinfragmente aus einem SDS-Gel ausgeschnitten und mittels Trypsin verdaut. Die Probe wurde daraufhin durch Elektrosprayionisation (ESI) schonend ionisiert, und es erfolgte eine grobe Auftrennung nach dem Masse/Ladungsverhältnis mittels Quadrupol. Je nach angelegter Spannung konnten nur Fragmente eines bestimmten Masse/Ladungsverhältnisses das System passieren. Um eine bessere Massenauftrennung zu erlangen, erfolgte eine weitere Auftrennung in einem Flugzeitmassenanalysator (*Time of Flight*; TOF). Hierbei fand die Massenanalyse über die Zeitmessung zwischen dem Eintritt der Ionen in das System und dem Zeitpunkt der Ankunft am Detektor statt. Die hierbei entstehenden Fragmente sind charakteristisch für das eingesetzte Protein und lassen sich mit einer Datenbank von Proteinprimärsequenzen vergleichen.

5.3.4 CFG-Analysen

Das *Consortium of functional Glycomics* (CFG, www.functionalglycomics.org) ermöglicht ein sogenanntes *Glycan array screening*, mit dem man in der Lage ist, eine Vielzahl an verschiedenen Glykanstrukturen als mögliche Liganden zu testen. Verschiedene synthetisch hergestellte Polyglykane sind über unterschiedliche Linker auf einem Glas-Chip fixiert. Der in dieser Arbeit verwendete Glykan-Chip *Mammalian Printed Array version 5.1* enthält 610 verschiedene Glykanliganden. Das CFG benötigt für die Analyse eine Proteinmindestmenge von 50 μ l mit einer Proteinkonzentration von 2 mg/ml. Zur Identifikation von möglichen Bindungspartnern wurde das jeweilige rekombinante Protein mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und mit einem definierten Puffer (CFG-Puffer) auf 200 μ g/ml verdünnt. Anschließend wurde die Lösung 2 Stunden auf der Oberfläche des Glykan-Chips inkubiert. Die

folgende Detektion der gebundenen Glykane erfolgt über Messung der Fluoreszenz. Von jedem Glykan sind sechs Messpunkte vorhanden, sodass die zwei Extrema verworfen wurden und der Mittelwert lediglich aus den verbleibenden vier Werten gebildet wurde (Blixt, *et al.*, 2004). Für die Fluoreszenzmarkierung der verschiedenen EpaA-Domänen wurde AlexaFluor 488-Sulphodichlorphenylester (*Invitrogen*) als Fluoreszenzfarbstoff verwendet. Er bindet kovalent an primäre Amine (Lysin, N-Terminus des Proteins) (Sherman, 1991). Um sicherzustellen, dass ein genügend großer Anteil an nicht-protonierten Lysinen vorliegt, ist es nötig, einen leicht basischen pH-Wert während der Markierung zu verwenden, da der pKa der ϵ -Aminogruppe bei ~ 10 liegt. Wenn die N-terminalen Aminosäuren des Proteins selektiv markiert werden sollen, müsste der pH-Wert neutral gewählt werden, da diese Amine einen niedrigeren pKa-Wert haben. Vor der Fluoreszenzmarkierung wurden die Proteine in 100 mM NaHCO₃-Puffer (pH 8,3) umgepuffert, da die Aufreinigungspuffer 20 mM Tris enthalten und dieses aufgrund der primären Amine selbst markiert werden würde. 1 mg Fluoreszenzfarbstoff wurde in 100 μ l DMSO (10 mg/ml) gelöst und jeweils etwa 7,5 μ l Fluoreszenzfarbstoff-Lösung zu 100 μ l Protein gegeben. Es folgte eine Inkubation von 2 Stunden bei 25 °C. Der überschüssige Farbstoff wurde mit Hilfe von Konzentratoren entfernt, wobei die Proteinlösung gleichzeitig in den CFG-Puffer umgepuffert wurde. Über SDS-PAGE und anschließende UV-Belichtung wurde die Fluoreszenz überprüft. Die fluoreszenzmarkierten Proben besaßen eine Konzentration von mindestens 2 mg/ml in mindestens 50 μ l und wurden eisgekühlt verschickt.

5.3.5 Spektroskopie mit zirkular polarisiertem Licht

Die Circular dichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie) wird zur Analyse der Sekundärstruktur sowie zur Bestimmung der thermischen Stabilität von Proteinen eingesetzt. Dazu wurden CD-Messungen im fernen UV Bereich durchgeführt (195 – 260 nm). Schon bei geringen Konzentrationen (ca. 200 μ g/ml) konnten Aussagen über die Sekundärstruktur gemacht werden. Die Messungen basieren auf dem Effekt, dass circular polarisiertes Licht, je nach Händigkeit der optisch aktiven Probe, unterschiedlich stark absorbiert wird. Auch die Sekundärstruktur von Proteinen hat auf dieses Absorptionsverhältnis Einfluss, somit können zudem mittels CD-Spektroskopie Analysen der Sekundärstruktur gemacht und Schmelzkurven bestimmt werden (Greenfield, 1996, Kelly, 2000). Für die Messungen wurden das Spektropolarimeter

J-810 (*Jasco*) und Quarzglasküvetten mit einer Schichtdicke von 1 mm (*Hellma*), verwendet. Gemessen wurde in 10 mM NaHCO₃-Puffer (pH 8,3). Alle Spektren wurden gegen den verwendeten Puffer als Nullwert gemessen. Jede Messung wurde dreimal wiederholt und gemittelt. Spektren zur Analyse der Sekundärstruktur wurden bei 10 °C und Konzentrationen von etwa 200 µg/ml zwischen 195 und 260 nm aufgenommen. Die Schmelzkurven wurden mit gleicher Proteinkonzentration in einem Temperaturbereich von 10 bis 95 °C aufgenommen, dabei wurde die Proteinprobe pro Minute um 2 °C aufgeheizt und wieder abgekühlt. Diese Messung wurde bei der Wellenlänge aufgenommen, bei welcher zuvor der größte Unterschied zwischen nativem und denaturierten Zustand beobachtet wurde.

Tabelle 33: Einstellungen für CD-Spektroskopie.

Einstellung Sekundärstruktur	Parameter	Einstellung Schmelzkurve
Standard (100 mdeg)	Sensivität	Standard (100 mdeg)
---	Wellenlänge	Δ nm
260 nm	Start	10 °C
195 nm	Stop	95 °C
0,2 nm	Datenpunkte	0,5 °C
continious	Modus	---
50 nm/min	Geschwindigkeit	50 nm/min
2 Sekunden	Integrationszeit	2 Sekunden
1 nm	Spaltbreite	1 nm
3	Wiederholungen	---

Die erhaltenen Messwerte wurden anschließend wie folgt normiert:

$$[\theta]_{norm} = \frac{m_{prot} \cdot \theta}{(n - 1) \cdot 10 \cdot d \cdot c}$$

$[\theta]_{norm}$: Normierte Elliptizität; m_{prot} : Masse des Proteins in Da; n : Anzahl der Aminosäurereste; d : Dicke der Küvette; c : Konzentration der Proteinlösung in g/ml

5.3.6 Fluoreszenz-Spektroskopie

Fluoreszenz kann bei vielen Verbindungen mit Aromaten oder mit Doppelbindungssystemen beobachtet werden. Dieses Phänomen beruht auf der Lichtanregung eines Fluorophors in einen höheren elektrischen Energiezustand und der anschließenden Lichtaussendung bei der nachfolgenden Desaktivierung

(Abbildung 63). Dem Franck-Condon-Prinzip gehorchend, erfolgt zunächst ein vertikaler Übergang in den energetisch höheren Zustand mit dem größten Überlappungsintegral, wobei häufig auch ein angeregter Schwingungszustand erreicht wird. Dieser angeregte Schwingungszustand desaktiviert strahlungslos in einen angeregten Schwingungsgrundzustand, aus welchem anschließend die elektronische Desaktivierung unter Lichtaussendung erfolgt, welche als Fluoreszenz bezeichnet wird und aufgrund des *Stokes Shift* rotverschoben im Vergleich zum eingestrahlt Licht ist.

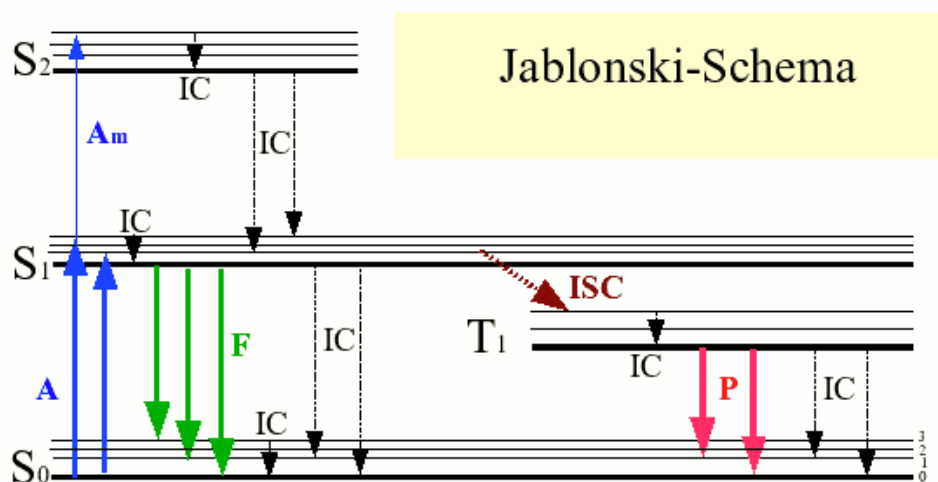


Abbildung 63: Jablonski-Diagramm verschiedener Energieübergänge.

In dieser Arbeit wurde die in Grün markierte Fluoreszenzstrahlung der intrinsischen Fluorophore unter Zugabe verschiedener Glykanliganden beobachtet.

Allgemein kann man bei der Fluoreszenzspektroskopie zwischen intrinsischen und extrinsischen Fluorophoren unterscheiden, wobei ausschließlich mit den Ersteren in dieser Arbeit gearbeitet wurde. Dabei handelt es sich um Fluorophore, die direkt im Analyten enthalten sind und selbst fluoreszieren können. Hierzu zählen Tyrosine und Tryptophane, die mit einer Wellenlänge von 280 nm angeregt wurden und deren Emissionsmaximum zwischen 340 und 350 nm beobachtet werden konnte. Durch die Zugabe verschiedener Glykanliganden lässt sich die Fluoreszenz der eben genannten Aminosäuren innerhalb der Bindungstasche verringern (*quenchen*), was auf der Tatsache beruht, dass die Anregungsenergie aufgrund von Stoßreaktionen an den in räumlicher Nähe befindlichen Liganden übertragen wird, welcher anschließend strahlungslos desaktiviert. Dieser sogenannte Fluoreszenzquench wurde für die A-Domänen von Epa1, Epa3, Epa6, Epa7, Epa12, Epa22 und Epa23 durch Zugabe verschiedener Glykanliganden beobachtet. Dazu wurden 500 μ l einer Proteinlösung (0,01 mg/ml) in FS-Puffer in eine rührbare Quarzglasküvette gegeben, für eine halbe

Stunde bei 10 °C rührend äquiliibriert und anschließend mit der Substratlösung titriert. Diese enthielt die gleiche Menge an Protein um Verdünnungseffekte auszuschließen. Zwischen den einzelnen Titrationsschritten wurde jeweils 1,30 Minuten gerührt und die Probe anschließend vor der Messung 30 Sekunden stehen gelassen. Nachfolgend ist das Titrationsschema dargestellt, welches für alle Proteine angewandt wurde.

Tabelle 34: Titrationsschema für Fluoreszezspektroskopie.

Stock (mM)	V_{Zugabe} (µl)	Endkonz. (µM)
0	0	0,00
0,125	1	0,25
0,125	1	0,50
0,125	2	0,99
0,125	4	1,97
0,125	8	3,88
1	2	7,74
1	2	11,58
1	4	19,22
1	4	26,79
1	8	41,72
1	8	56,42
1	8	70,92
10	2	107,02
10	3	160,88
10	4	232,18
10	4	302,98
10	6	408,05

Um im Anschluss aus den erhaltenen Werten die Dissoziationskonstante zu berechnen wurde zunächst der Fluoreszenzquench gegen die Ligandenkonzentration aufgetragen. Der Fluoreszenzquench konnte zuvor anhand der Maxima der verschiedenen Emissionsspektren über folgende Formel errechnet werden.

$$Q(c) = \left(1 - \frac{FI(c)}{FI(0)}\right) \cdot 100$$

Q(c): prozentualer Fluoreszenzquench, FI(c): Fluoreszenzintensität bei Konzentration c,
FI(0): Fluoreszenzintensität bei Konzentration 0

Die Dissoziationskonstante wurde durch einen nicht-linearen Fit berechnet, welcher sich mittels der nachfolgenden Gleichung bestimmen lässt und eine spezifische Bindung mit der Bindungsstelle im Verhältnis 1:1 voraussetzt.

$$K_D = \frac{Q(max) \cdot c}{Q(c)} - c$$

K_D : Dissoziationskonstante, $Q(max)$: maximaler Fluoreszenzquench, $Q(c)$: prozentualer Fluoreszenzquench, c : Konzentration des Liganden

5.4 Proteinkristallographische Methoden

5.4.1 Kristallisationsscreening

Im Jahre 1958 gelang erstmals die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur eines Proteins mittels Röntgenbeugung an einem Einkristall. 1962 erhielten Kendrew und Perutz für diese Arbeit den Nobelpreis der Chemie. Für die Aufklärung von dreidimensionalen Strukturen eines Proteins mittels Röntgenbeugung ist es unumgänglich, gut streuende Proteinkristalle zu erhalten. Es gibt viele Faktoren, die die Bildung gut streuender Proteinkristalle bewirken. Hierzu zählen unter anderem der pH-Wert, die Konzentration und Art des Fällungsmittels, Konzentration und Art von Salzen, das Puffersystem, die Temperatur als auch das Protein selbst und seine Konzentration (Rhodes, 2006). Da sich diese Faktoren kaum vorhersagen lassen, führt man zunächst ein rein empirisches Screening mit verschiedenen Bedingungen durch. Dazu wurden käuflich erhältliche Kristallisationsscreens der Firma *Qiagen* verwendet. Im Einzelnen wurden folgende Screens getestet.

Tabelle 35: Verwendete Kristallisationsscreens.

Die Zusammensetzungen der Präzipitantlösungen der verwendeten Kristallisationsscreens sind auf der Webseite der Firma *Qiagen* zu finden (Qiagen, 2012).

Screen	Anmerkung
JCSG Core I-IV	Optimiert, als bereits erfolgreich bekannte Bedingung
Classics	Klassische, literaturbekannte Lösungen
Anions	Verschiedene Salze bei jeweils zwei Konzentrationen
AmSO ₄	Ammoniumsulfat als Fällungsmittel
MBCI und MBCII	Bedingung bevorzugt für Membranproteine

Als Kristallisationsmethode wurde beim ersten *Screening* die Dampfdiffusion im geschlossenen System mittels *sittig-drop* angewandt. Der Tropfen mit Proteinlösung befindet sich dabei in einer Vertiefung über dem Reservoir und wird mit einem Tropfen der Kristallisationslösung im Reservoir gemischt. Dadurch ist die Salz- und Präzipitanskonzentration im Tropfen geringer als im Reservoir, weshalb über die Gasphase eine Gleichgewichtseinstellung stattfindet, die dem osmotischen Druck folgt, weshalb der Tropfen in der Regel aufgrund seines abnehmenden Wassergehalts kleiner wird. Dabei steigt die Konzentration von Salz, Präzipitans und Protein an, was im Idealfall zur Bildung einiger Kristallkeime führt, die im Weiteren zu wohlgeordneten Kristallen heranwachsen (Davies, 1971). Die Proteinproben wurden in Konzentrationen von 8 – 25 mg/ml mit Hilfe von Kristallisationsrobotern (Digitalab Honeybee 963 und Cartesian Microsys SQ 400) a 300 nl auspipettiert und mit der gleichen Menge an Kristallisationslösung vermischt, dabei lagen die Proteine in einem AML-Puffer vor. Dabei wurden Kristallisationsplatten mit 96 einzeln abgeschlossenen Vertiefungen verwendet (*96well Innovaplate; innovadyne*). In diese wurde zuerst die Kristallisationslösung in ein Reservoir gegeben (80 µl), wovon besagte 300 nL auf eine dafür vorgesehenen Tropfenposition pipettiert wurden. Die Proteinlösung wurde im Anschluss hinzu pipettiert, die Platte luftdicht verschlossen (*ViewSeal; Greiner Bio-One*) und bei 4°C oder 18°C gelagert. Zudem wurden einzelne Screens unter Zugabe von Nanopartikeln auspipettiert (Tabelle 36 und Tabelle 37).

Tabelle 36: Kristallisationsscreenings verschiedener EpaA-Domänen.

Die verwendeten Konzentrationen an aufgereinigtem Protein sowie die Zugabe von Nanopartikeln (NP) als Kristallisationskeime sind für die verwendeten Screening-Bedingungen aufgeführt.

	Anions	AmSO ₄	Classics	JCSG Core I	JCSG Core II	JCSG Core III	JCSG Core IV	MBC I	MBC II
Epa2	---	---	---	15 mg/ml	---	---	---	---	---
Epa3	20 mg/ml+NP	15 mg/ml	20 mg/ml+NP 15 mg/ml	20 mg/ml+NP 15 mg/ml	20 mg/ml+NP 15 mg/ml	20 mg/ml+NP 15 mg/ml	20 mg/ml+NP 15 mg/ml	20 mg/ml+NP 15 mg/ml	20 mg/ml+NP 15 mg/ml
Epa6	---	15 mg/ml	15 mg/ml	15 mg/ml	15 mg/ml	15 mg/ml	15 mg/ml	15 mg/ml	15 mg/ml
Epa7	15 mg/ml+NP	15 mg/ml	15 mg/ml+NP 15 mg/ml	15 mg/ml+NP 15 mg/ml	15 mg/ml+NP 15 mg/ml	15 mg/ml+NP 15 mg/ml	15 mg/ml+NP 15 mg/ml	15 mg/ml+NP 15 mg/ml	15 mg/ml+NP 15 mg/ml
Epa9	15 mg/ml+NP	15 mg/ml	15 mg/ml+NP 15 mg/ml	15 mg/ml+NP 15 mg/ml	15 mg/ml+NP 15 mg/ml	15 mg/ml+NP 15 mg/ml	15 mg/ml+NP 15 mg/ml	15 mg/ml+NP 15 mg/ml	15 mg/ml+NP 15 mg/ml
Epa12	---	10 mg/ml	10 mg/ml	10 mg/ml	10 mg/ml	10 mg/ml	10 mg/ml	10 mg/ml	10 mg/ml
Epa19	---	---	---	15 mg/ml	---	---	---	---	---
Epa23	20 mg/ml+NP	15 mg/ml	20 mg/ml+NP 15 mg/ml	20 mg/ml+NP 15 mg/ml	20 mg/ml+NP 15 mg/ml	20 mg/ml+NP 15 mg/ml	20 mg/ml+NP 15 mg/ml	20 mg/ml+NP 15 mg/ml	20 mg/ml+NP 15 mg/ml

Die Dokumentation des Kristallwachstums fand mit Hilfe des Dokumentationssystems Rockimager der Firma *Formulatrix* statt. Dieses System ist in der Lage, neben der direkten Lagerung der Kristallisationsplatten auch die Dokumentation in voreingestellten Intervallen (In diesem Falle nach 0, 6, 12, 24, 48, 72 Stunden und danach wöchentlich) vorzunehmen. Die Ergebnisse wurden fotografisch festgehalten. Ansonsten erfolgte die Beobachtung des Kristallwachstums manuell mittels eines Mikroskops (McPherson, 1982). Im Fall von Epa9 konnte das Kristallwachstum durch Zugabe von Nanopartikeln deutlich verbessert werden, jedoch wurden überwiegend Nadelbüschel erhalten, die sich nicht für nachfolgende Röntgenbeugungsexperimente eignen. Zudem konnte für Epa3, Epa6, Epa7, Epa9, Epa12 und Epa23 Kristallwachstum bei verschiedenen Bedingungen beobachtet werden, aus welchen Kristalle entnommen und für Röntgenbeugungsexperimente verwendet wurden.

Tabelle 37: Kristallisationsscreenings der CBL2 Varianten Epa1A^{CBL2Epa9}, Epa3A^{CBL2Epa2} und Epa9A^{CBL2Epa1}.

Die auspipettierten Konzentrationen an aufgereinigtem Protein sind für die verwendeten Screening-Bedingungen aufgeführt.

	JCSG Core I	Classics	MBC I
Epa1A^{CBL2Epa9}	12 mg/ml	12 mg/ml	---
Epa3A^{CBL2Epa2}	12 mg/ml	---	12 mg/ml
Epa9A^{CBL2Epa1}	12 mg/ml	---	12 mg/ml

5.4.2 Reproduktion und Optimierung von Proteinkristallen

Bei Bedingungen, in denen vielversprechende Kristalle gefunden wurden, erfolgte anschließend eine Reproduktion mit Hilfe des *hanging-drop*-Verfahrens in Crystallization-Tool-Platten (*Qiagen*). Das *hanging-drop*-Verfahren beruht ebenfalls auf dem Prinzip der Dampfdiffusion im geschlossenen System. Dabei wurden 150 µl der Screeninglösung entnommen und in ein Reservoir der Crystallization-Tool-Platte pipettiert. Auf dem Deckel wurde 1 µl Proteinlösung mit 1 µl Reserviörlösung vermischt. Das Reservoir wurde luftdicht mit dem Deckel verschlossen. Des Weiteren wurde in solchen Fällen eine Optimierung durchgeführt, welche dazu dient, die in der Bedingung vorhandenen Parameter (pH-Wert, Konzentration des Präzipitans, Puffer,

Salze, Zugabe von Ligand) so zu variieren, dass Kristalle von höherer Qualität und Quantität erhalten werden. Die verwendeten Lösungen wurden hierbei selbst hergestellt und steril filtriert.

5.4.3 *Micro-seeding*

Des Weiteren wurde die Methode des *Micro-seedings* im Zuge der Optimierung angewandt. Bei dieser Methode wird ein Kristallisationskeim in einen Tropfen aus Protein- und ReservoirLösung überführt. Grundlage des *Seedings* ist die unterschiedlich hohe Energiebarriere zur Kristallausbildung (Bergfors, 2003). Die spontane Nukleation findet bevorzugt bei hoher Übersättigung statt, wohingegen langsames und gleichmäßiges Kristallwachstum bei geringer Übersättigung stattfindet. Zur Herstellung der Seedinglösung wurde ein Proteinkristall aus einer Optimierungsbedingung entfernt und mit 50 µl Puffer vermischt. Mit Hilfe einer Edelstahlkugel wurde der Kristall durch kurzes Vortexieren zerkleinert, die dabei erhaltene *Micro-seeding*-Lösung wurde auf Eis gelagert. Anschließend wurden die Kristallisationskeime mit Hilfe eines Katzenschnurrbarthaars in die Kristallisationslösung aus 1 µl Protein- und 1 µl ReservoirLösung überführt. Dazu wurde das Schnurrhaar in die *seeding*-Lösung eingetaucht und anschließend durch den Kristallisationstropfen gezogen. Zudem wurde das bereits vorgestellte *Screening* in Anwesenheit von Nanopartikeln durchgeführt. Dabei handelt es sich ebenfalls um kleine Kristallisationskeime, die bereits beim Auspipettieren des Screens zugefügt werden.

5.4.4 *Soaking von Kristallen mit potentiellen Glykanliganden*

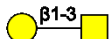
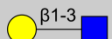
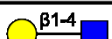
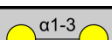
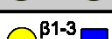
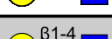
Mittels der GFG-Analysen konnten verschiedene Kohlenhydrate als Liganden der verschiedenen EpaA-Domänen identifiziert werden. Durch das sogenannte *Soaking* besteht die Möglichkeit, diese Glykane in zuvor geformte Kristalle einzubringen und durch die Röntgenstrukturaufklärung die Bindung des Liganden an das Protein zu charakterisieren (Hassell, *et al.*, 2007). Dies wird häufig ausgenutzt, um Inhibitoren für Proteine zu entwickeln und zu charakterisieren (Munshi, *et al.*, 1998). Im Fall der in dieser Arbeit untersuchten Proteine wurden *Soakings* mit verschiedenen Glykanen aus 4.4 durchgeführt, die als Ligand in Frage kamen. Zum *soaken* wurden Proteinkristalle aus ihren Mutterlaugen entnommen. Anschließend erfolgten zwei Waschschrte in EDTA-haltigem Puffer (10 Minuten, über Nacht), sodass bereits vorhandene Liganden aus der Bindungstasche entfernt wurden. Danach wurden die Proteine in einen

calciumhaltigen Puffer überführt. Zuletzt wurden die gewünschten Glykan-Liganden mit Hilfe einer feinen Nadel als kristalliner Feststoff zu dem Protein-Reservoir-Lösungs Gemisch zugefügt und über Nacht inkubiert.

Im Fall von Epa6 und Epa9 konnte das Kristallwachstum in 24-Well-Platten mittels Dampfdiffusion und *hanging-drop*-Verfahren reproduziert werden. Dabei wurden die Tropfen aus Protein- und Reservoirlösung mit Kristallisationskeimen versetzt. Nach einer Woche konnten bereits neue Kristalle beobachtet werden, welche für das anschließende *Soaking* eingesetzt wurden (Tabelle 38). Die verschiedenen Substratliganden wurden aufgrund der mittels CFG-Analysen erhaltenen Ergebnisse bei der Firma *Dextra* erworben (Tabelle 8).

Tabelle 38: *Soaking*-Bedingungen der A-Domänen von Epa6 und Epa9.

Für das jeweilige Protein sind sowohl Kristallisationsbedingung als auch der verwendete Ligand gemäß CFG-Nomenklatur aufgeführt. Nach dem *Soaking* wurden die verschiedenen Kristalle mit 20 % Glycerin als Cryoprotektant in flüssigen Stickstoff eingefroren und am BESSY (BESSY II) in Berlin vermessen.

Protein	Reservoirlösung	Glykanligand	Aufbau
Epa6	JCSG Core II G5	T-Antigen	
Epa6	JCSG Core II G5	Lacto-N-biose	
Epa6	Classics H2	N-Acetyl-D-lactosamin	
Epa6	Classics H2	α 1-3 Galactobiose	
Epa9	JCSG Core III D7	Lacto-N-biose	
Epa9	MBC II F2	N-Acetyl-D-lactosamin	

5.4.5 Vorbereiten der Kristalle

Kristalle, die für nachfolgende Röntgenbeugungsexperiment von Interesse waren, wurden mit Hilfe von MicroMounts (*MiTeGen*, Inthaca, USA) oder CryoLoops (*Hampton Research*, Aliso Viejo, CA) unter einem Lichtmikroskop aus der jeweiligen Bedingung entnommen und in Cryopuffer gesoakt. Anschließend wurden die Kristalle etwa 1 Minute in flüssigem Stickstoff schockgefroren und nachfolgend in das Transportdewar überführt. Der Cryopuffer entspricht den Reservoirbedingungen, die teilweise mit 20 % Glycerin vermischt wurden, um der Bildung von Eiskristallen beim Einfrieren entgegenzuwirken.

5.4.6 Röntgenbeugung

Die eingefrorenen Kristalle wurden nachfolgend für Röntgenbeugungsexperimente an einer Synchrotronstrahleneinrichtung verwendet (ESRF, Grenoble, F oder BESSY, Berlin, D). Dazu müssen die Kristalle auf einen Goniometerkopf befestigt und im Röntgenstrahl ausgerichtet werden. Während der Messung werden die Kristalle mittels Kaltgas auf 100 K gekühlt, um der Kristallschädigung durch den Röntgenstrahl entgegenzuwirken und die Aufnahme von mehreren Datensätzen zu ermöglichen. Dann wurden zunächst zwei Testbilder im Winkel von 90° zueinander aufgenommen, um im Anschluss die Zellparameter und Raumgruppen der Kristalle mit Hilfe des Programme *Imosflm* (Leslie, *et al.*, 2002, Battye, *et al.*, 2011) zu bestimmen und zu berechnen. Hierdurch wird das Sammeln von möglichst vollständigen und hoch aufgelösten Datensätzen eines Kristalles ermöglicht. Belichtungszeit und Oszillationswinkel, um den ein Kristall während der Aufnahme eines Bildes gedreht wird, können variiert werden.

5.4.7 Prozessierung

Die gemessenen Reflexe wurden durch das Programm *XDS* (Kabsch, 2010) integriert. Jeder Reflex *hkl* wird dabei erfasst, und es werden Korrekturen an verschiedener Parameter durchgeführt und berechnet, um die Intensität des Reflexes zu bestimmen. Hierzu zählen die Strahlposition, der Detektorabstand, die Kristallmosaizität und der genaue Zellparameter. Zudem wurden hierbei Qualitätsparameter, wie die Vollständigkeit, R_{merge} und der Rauschabstand $I/\sigma(I)$, berechnet. Unter Vollständigkeit versteht man den Anteil an möglichen Reflexen und R_{merge} gibt den Intensitätsunterschied zwischen symmetrieäquivalenten Reflexionen an. Das Zusammenfassen der symmetrieäquivalenten Reflexe und das Skalieren, was als *mergen* bezeichnet wird, wurde mit *XSCALE* (Kabsch, 2010) aus dem CCP4-Paket (Collaborative Computational Project, 1994) durchgeführt. Dabei werden getrennt gemessene Datensätze wieder zusammengefügt, um die maximale Auflösung zu erlangen. Gleichzeitig wurde hierbei die maximale Auflösung bestimmt, bis zu welcher ein Datensatz sinnvolle Informationen ergibt. Hierfür wurden die verschiedenen Qualitätsparameter benötigt. Dabei muss darauf geachtet werden, dass der Wilson-Plot einen linearen Verlauf hin zu hoher Auflösung zeigt, der Rauschabstand $I/\sigma(I)$ einen

Wert von 2 in der höchsten Auflösungsschale nicht unterschreitet und der R_{merge} -Wert in derselben Schale nicht über 70 % ansteigt.

5.4.8 Phasenbestimmung

Die Elektronendichte innerhalb einer Einheitszelle lässt sich wie folgt beschreiben.

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l F_{hkl} e^{-2\pi(hx+ky+lz)}$$

Die Gleichung stellt die Fouriersumme aus allen Strukturfaktoren F_{hkl} dar, die jeweils eine einzelne Reflektion beschreiben, V stellt dabei das Volumen der Einheitszelle dar. F_{hkl} stellt eine Wellenfunktion dar und kann durch die Terme Frequenz, Amplitude und Phase beschrieben werden. Mit Hilfe der vom Röntgendetektor aufgezeichneten Reflexen kann die Amplitude $|F_{hkl}|$ ermittelt werden, welche proportional zu $(I_{hkl})^{1/2}$ ist. Da die Phase α_{hkl} , mit der der gebeugte Röntgenstrahl auf den Detektor trifft, sich nicht experimentell bestimmen lässt, können aus den Daten, die bei einem Röntgenbeugungsexperiment erhalten werden, nicht direkt Elektronendichtekarten berechnet werden, weshalb die Bestimmung der Phasen über Umwege geschehen muss. Zum Bestimmen der Phasen wurde in dieser Arbeit die Methode des molekularen Ersatzes (*molecular replacement*, *MR*)(156) angewandt. Hierbei werden die Phasen einer bereits bekannten Struktur verwendet, die voraussichtlich eine strukturelle Ähnlichkeit zu der zu lösenden Proteinstruktur aufweist. Die Vorhersage der Strukturähnlichkeit beruht auf ähnlichen Proteinsequenzen, Funktionen oder anderen Verwandtschaftsmerkmalen. Bei Sequenzidentitäten von über 30 % wird davon ausgegangen, dass das *MR* erfolgversprechend ist, es können aber auch Suchmodelle mit einer 20 %igen Sequenzidentität zum Erfolg führen (DiMaio, *et al.*, 2011). Dabei wird das Suchmodell meist zuvor so angepasst, dass spezifische Schleifen oder andere hervorstechende Bereiche abgetrennt werden, um eine höhere Vergleichbarkeit zu der zu lösenden Struktur zu erhalten. Mittels gebräuchlicher *MR*-Programme wird dann das Problem von sechs Freiheitsgraden, in welchen das Suchmodell bewegt werden muss, auf zwei mal drei herunter gebrochen. Dabei wird das Suchmodell zunächst um alle drei Raumachsen rotiert und mittels *maximum-likelihood*-Algorithmen die beste Position festgestellt. Anschließend wird das ideal positionierte Modell in alle drei Raumrichtungen translatiert, um die am besten zu den experimentellen Daten passende

Position nochmals durch *maximum-likelihood*-Algorithmen zu bestimmen. Dabei wird der sogenannte *Z-Score* als Qualitätsmerkmal berechnet. Dieser setzt sich aus dem logarithmischen *likelihood gain* (LLG_L) der gefundenen Lösung abzüglich eines logarithmischen *likelihood gain* (LLG_R) einer zufälligen Orientierung, geteilt durch die Standardabweichung einer zufälligen Auswahl an LLG-Werten vom Mittel, zusammen.

$$Z = \frac{LLG_L - LLG_R}{RMSD(LLG)}$$

Um einen verfälschenden Einfluss des Suchmodells auf die Strukturlösung zu vermeiden, muss die Strukturlösung mittels Molekularer Ersatz mit Vorsicht durchgeführt werden. Dabei muss bedacht werden, dass der Informationsgehalt der Phase eines Reflexes stets höher ist als der Informationsgehalt der Intensität dieses Reflexes. Sind nun die ersten experimentellen Phasen ermittelt, kann ein erstes Modell der neu zu lösenden Proteinstruktur automatisiert mittels *ARP/wARP* (Morris, 2003), erstellt werden.

5.4.9 Verfeinerung

Zum Verfeinern der Proteinstrukturen wurde *Coot* (Emsley, 2010) und *refmac5* (Murshudov) angewandt. *Coot* dient dem manuellen Modellbau und *refmac5* der automatischen Verfeinerung. Die Verfeinerung erfolgte nach dem Prinzip des *maximum likelihood gain*. Zunächst müssen die beiden Faktoren R_{work} und R_{free} bestimmt werden. R_{work} gibt die bei der Verfeinerung verwendeten Reflexe an wohingegen R_{free} den Wert der Testreflexe angibt. Die Testreflexe werden direkt nach der Skalierung festgelegt und bestehen aus etwa 5 % der gemessenen Reflexe. Sie werden für jeden weiteren Datensatz derselben Kristallform angewandt, werden jedoch nicht für die Strukturbestimmung verwendet (Brunger, 1992). R_{work} und R_{free} gelten als Qualitätsparameter und geben an, wie gut die aus dem Modell berechneten Strukturfaktoramplituden $|F_{calc}|$ zu den experimentell beobachteten Strukturfaktoramplituden $|F_{obs}|$ passen.

$$R = \frac{\sum ||F_{obs}| - |F_{calc}||}{\sum |F_{obs}|}$$

5.4.10 Darstellen der Strukturen

Die Abbildungen von Proteinstrukturen wurden mit *PyMOL* (DeLano, 2002) erstellt. Elektrostatische Oberflächen wurden mit *APBS* (Baker, *et al.*, 2001) und hydrophobe Oberflächen mit *VASCo* (Steinkellner, *et al.*, 2009) berechnet.

5.5 *in vivo* Untersuchung der EpaA-Domänen

Wie bereits in Abschnitt vorgestellt, galt es, die verschiedenen EpaA-Domänen *in vitro* funktionell und strukturell zu untersuchen. Um zu überprüfen, welche Bindungseigenschaften die verschiedenen EpaA-Domänen im lebenden Organismus vermitteln, wurde *S. cerevisiae* als Modellorganismus angewandt. Aufgrund der hohen genomischen Ähnlichkeit von *C. glabrata* zu seinem nicht-pathogenen Verwandten *S. cerevisiae* wurden die verschiedenen EpaA-Domänen auf der Oberfläche von *S. cerevisiae* präsentiert. Die benötigten Hefe-Expressionsplasmide wurden, wie in Abschnitt 5.1 beschrieben, hergestellt und anschließend in den Modellorganismus transformiert.

5.5.1 Herstellung kompetenter *S. cerevisiae* Zellen

Um kompetente *S. cerevisiae*-Zellen herzustellen, wurde der benötigte Stamm zuerst auf YPD-Festmedium ausgestrichen und für ein bis zwei Tage bei 30 °C inkubiert. Das Zellmaterial wurde anschließend zum Animpfen einer 5 – 10 ml YPD-Kultur verwendet, welche über Nacht schüttelnd bei 30 °C inkubiert wurde. Am nächsten Tag wurde eine 50 ml Hauptkultur auf eine OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft und bei 30 °C schüttelnd bis zu einer OD₆₀₀ von 0.8 – 0.9 wachsen gelassen. Die Hauptkultur wurde in ein Falcontube überführt und 2 Minuten bei 2000 rpm und Raumtemperatur pelletiert. Anschließend wurde das Zellpellet mit 20 ml sterilem Wasser und dann mit 10 ml SORB-Puffer gewaschen. Die Zellen wurden vorsichtig in 360 µl SORB-Puffer aufgenommen und mit 60 µl frisch aufgekochter *Carrier*-DNA (Heringssperma-DNA) versetzt, was die Transformationseffizienz steigert. Je 60 µl der Zellsuspension wurde in sterile 1.5 ml sterile Eppendorfgefäße überführt und bei -80 °C gelagert oder direkt transformiert (Guthrie, 1991).

5.5.2 Herstellung von Plasmiden zur Expression der *EPAA*-Domänen in *S. cerevisiae*

Die Gene der verschiedenen EpaA-Domänen wurden mittels der in Tabelle 9 beschriebenen Primer über PCR amplifiziert. Dabei diente die genomische DNA des *C. glabrata* Stammes CBS138 als Template. Die Fragmente wurden anschließend in die Suizidvektoren pJet1.2 ligiert und in chemisch kompetente *E. coli TOP10* Zellen transformiert. Nach Überprüfung der einzelnen Klone mittels analytischen Testverdaus und Sequenzierung wurden die Inserts über die zuvor während der PCR eingeführten Restriktionsstellen *SacII* und *SacI* aus dem Vektor geschnitten. Nach dem präparativen Restriktionsverdau und der darauffolgenden präparativen Agarosegelelektrophorese wurden die Inserts der verschiedenen *EPAA*-Domänen aus dem Agarosegel extrahiert und anschließend mit Hilfe des QIAquick Gel extraction Kits (*Qiagen*) gereinigt. Mit dem zuvor hergestellten Hefe-Expressionsplasmid BHUM2157 (P_{PGK} -*FLO11*^{AS1-30}-*SP-3HA-FLO11*^{AS214-1360}-*T_{FLO11}* YCplac33 *CEN URA3 AmpR*) wurde nach zuvor erfolgtem Verdau mittels der Restriktionsendonukleasen *SacII* und *SacI* ebenso verfahren. Die erhaltenen Fragmente der *EPAA*-Domänen wurden anschließend in das geöffnete Hefe-Expressionsplasmid zwischen den *3HA* Tag und die *FLO11B*-Domäne durch Ligation insertiert und erneut in chemisch kompetente *E. coli TOP10* Zellen transformiert. Um die Subklonierung zu überprüfen, wurde mit einzelnen Klonen ein analytischer Verdau durchgeführt. Konstrukte mit erwartetem Schnittmuster wurden anschließend sequenziert, um sicherzustellen, dass die *3HA-EPAA-FLO11BC*-Fusionsgene, deren Expression unter Kontrolle des konstitutiven *PGK1* (Phosphoglyceratkinase1)-Promotors steht, hergestellt werden können. Der Promotor gewährleistet eine effiziente Expression, und die einheitliche *FLO11BC*-Domäne macht es möglich, unterschiedliche EpaA-Domänen zu vergleichen. Die Konstrukte tragen außerdem ein *3HA* (Hämagglutinin)-Epitop, sodass alle *3HA-EpaA-Flo11BC*-Fusionsproteine mit dem gleichen Antikörper behandelt und über Immunfluoreszenz-Mikroskopie an der Oberfläche von *S. cerevisiae* nachgewiesen werden können (Tabelle 39).

Tabelle 39: Finale Konstrukte für *in vivo* Untersuchungen.

Die Expression aller Konstrukte steht unter Kontrolle des *PGK1*-Promotors (P_{PGK1}). Das Sekretionssignal (SS) (*FLO11^{ΔSI-30}*), die BC-Domäne *FLO11BC* (*FLO11^{ΔS214-1360}*) und auch der Terminator (T) wurde von *FLO11* aus dem *S. cerevisiae*-Stamm Σ 1278b übernommen. Zusätzlich sind außerdem ein Spacer *SP* und ein 3HA-Tag (*3HA*) vorhanden. Als Plasmidrückgrat wurde der Vektor YCplac33 (B2445) verwendet. Die Farben korrespondieren mit den Farben der einzelnen EpaA-Domänen aus Abbildung 13.

Konstruktnamen	Plasmidnamen	Konstrukt
YCplac33	B2445	
ΔA	BHUM1964	
$\Delta A+HA$	BHUM2157	
Flo11A	BHUM2158	
Epa1A	BHUM1983	
Epa2A	BHUM1985	
Epa3A	BHUM2150	
Epa6A	BHUM2018	
Epa7A	BHUM1856	
Epa8A	BHUM1903	
Epa9A	BHUM1904	
Epa11A	BHUM2152	
Epa12A	BHUM2153	
Epa13A	BHUM1987	
Epa15A	BHUM2154	
Epa19A	BHUM2155	
Epa20A	BHUM2156	
Epa21A	BHUM1993	
Epa23A	BHUM1988	
Epa1A ^{CBL2Epa2}	BHUM1984	
Epa1A ^{CBL2Epa3}	BHUM2016	
Epa1A ^{CBL2Epa6}	BHUM2017	
Epa1A ^{CBL2Epa9}	BHUM2160	
Epa2A ^{CBL2Epa1}	BHUM2189	
Epa2A ^{CBL2Epa3}	BHUM2190	
Epa3A ^{CBL2Epa1}	BHUM2191	
Epa3A ^{CBL2Epa2}	BHUM2192	
Epa6A ^{CBL2Epa1}	BHUM2193	
Epa9A ^{CBL2Epa1}	BHUM2194	
Epa1A ^{C78S}	BHUM2171	
Epa1A ^{D165A}	BHUM2172	
Epa1A ^{W198A}	BHUM2173	
Epa1A ^{W198H}	BHUM2174	
Epa1A ^{W198Y}	BHUM2175	

5.5.3 Transformation von *S. cerevisiae*

Zur Transformation wurden 6 – 12 µl der Hefe-Expressionsplasmide mit einem Aliquot kompetenter Hefezellen und 300 µl sterilem PEG-Puffer gemischt und für 30 Minuten bei 30 °C inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 10 Minuten bei 42 °C mit anschließender 2-minütiger Zentrifugation der Zellen bei 2000 rpm. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml YPD-Flüssigmedium resuspendiert und etwa 30 Minuten bei 30 °C inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation (2000 rpm, 2 Minuten, Raumtemperatur) wurde das Zellpellet in der Restflüssigkeit aufgenommen und auf Selektionsmedium (SC-Ura) ausplattiert. Nach zweitägiger Inkubation bei 30 °C konnten die ersten Kolonien bei der Transformation beobachtet werden (Guthrie, 1991).

5.5.4 Kultivierung von *S. cerevisiae*

S. cerevisiae wurde in YPD-Medium oder zur Selektion von Zellen, die ein Plasmid aufgenommen haben, in synthetischem Komplexmedium SC-Ura schüttelnd bei 30 °C kultiviert. Inkubation auf Agar-Platten erfolgte für 2 Tage bei 30 °C. Durch Messung der optischen Dichte bei 595 nm mit Hilfe eines Photometers wurde das Wachstum der Hefekulturen bestimmt. Eine $OD_{600} = 1$ entspricht dabei einer Zelldichte von etwas $1,5 \cdot 10^7$ Zellen/ml (Sherman, 1986).

5.5.5 Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie wurde in einem nächsten Schritt überprüft, ob die mit einem 3HA-Epitop fusionierten EpaA-Flo11BC-Proteine in *S. cerevisiae* produziert und in vergleichbarer Menge an die Zelloberfläche transportiert werden, um im Anschluss verschiedene Adhäsionstests mit *S. cerevisiae* Zellen, die verschiedene EpaA-Domänen auf ihre Oberfläche präsentieren, durchführen zu können. Hierfür wurden die zuvor hergestellten Hefe-Expressionsplasmide aus Tabelle 16 mit den verschiedenen *EPAA*-Domänen in den *S. cerevisiae* Stamm BY4741 (YHUM719) transformiert. Zum Nachweis der EpaA-Domänen wurden die nach der Transformation entstandenen Kolonien immunochemisch angefärbt (Abbildung 64). Für die Herstellung von Proben für die Immunfluoreszenz-Mikroskopie wurde zunächst eine Übernachtskultur mit Hefezellen in LFM-Medium angeimpft und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Die Hauptkultur wird auf eine OD_{600} von 0.2 angeimpft und schüttelnd

4 Stunden bei 30 °C inkubiert. Von der Hauptkultur werden je 3 ml in ein Eppendorfgefäß überführt und bei 2000 rpm für 3 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml PBS-Puffer mit 2 % (w/v) BSA resuspendiert. Die Zellen wurden erneut bei 2000 rpm für 3 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in 1 ml PBS-Puffer mit 2 % (w/v) BSA und dem Primärantikörper (Maus Anti-HA, monoklonal, Verdünnung 1:1000) aufgenommen. Während der folgenden 30-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur auf einem Rotationsinkubator (8 rpm) bindet der Primärantikörper spezifisch an sein Epitop. Danach wurden die Zellen dreimal mit 1 ml PBS-Puffer mit 2 % (w/v) BSA gewaschen und anschließend in 1 ml PBS-Puffer mit 2 % (w/v) BSA und dem Sekundärantikörper (Ziege Anti-Maus, Cy3-konjugiert, Verdünnung 1:10000) resuspendiert. Die Erkennung des Erstantikörpers durch den Zweitantikörper erfolgte, während die Zellen für 20 Minuten bei Raumtemperatur, im dunkeln auf einem Rotationsinkubator (8 rpm) inkubierten. Die Hefezellen wurden anschließend erneut dreimal mit 1 ml PBS-Puffer, versetzt mit 2 % (w/v) BSA, gewaschen. Das Pellet wurde schließlich in 350 – 450 µl PBS-Puffer, versetzt mit 2 % (w/v) BSA, aufgenommen. Die Proben konnten dann bei 4 °C in Dunkelheit gelagert werden. Für die mikroskopische Untersuchung der Hefezellen wurden Objektträger dünn mit 1 %iger Agarose beschichtet. Nach dem Trocknen wurden 5 µl der immunochemisch markierten Zellen auf die Agaroseschicht gegeben und mit einem Deckglas versehen. Anschließend konnten die Zellen am inversen Fluoreszenzmikroskop des Typs Axiovert 200M (*Carl-Zeiss*) mit einer CCD-Kamera 1394 ORCA-ERA (*Hamamtsu*) betrachtet werden. Die Konfiguration von Mikroskop und Kamera erfolgte durch das Programm Volocity (*PerkinElmer*). Anfänglich wurden die Zellen mit einem 63x Öl-Objektiv (*Carl-Zeiss*) mit Phasenkontrast beobachtet. Für die Aufnahme der roten Fluoreszenz wurde dann der Rhodamin-Filterwürfel (Anregung 551 nm, Emission 573 nm) verwendet, wobei eine Belichtungszeit von 600 ms eingestellt wurde. Die so entstandenen Aufnahmen wurden alle ohne softwareseitige Veränderungen des Kontrastes oder der Helligkeit aufgenommen. Die erhaltenen Bilder wiesen einen Maßstab von 10,062 Pixeln/µm auf und wurden mit dem Programm *ImageJ* (*Improvision*) bearbeitet. Es wurden mindestens 5 unabhängige Klone pro Konstrukt mikroskopiert. Insgesamt konnten für alle *EPAA*-exprimierenden Stämme im Vergleich zur Negativkontrolle deutliche Fluoreszenzsignale nachgewiesen werden, was darauf schließen lässt, dass die verschiedenen

3HA-EpaA-Flo11BC-Fusionsproteine synthetisiert und an die Oberfläche der Hefezelle transportiert werden und somit für funktionelle Studien zugänglich sind (Abbildung 64).

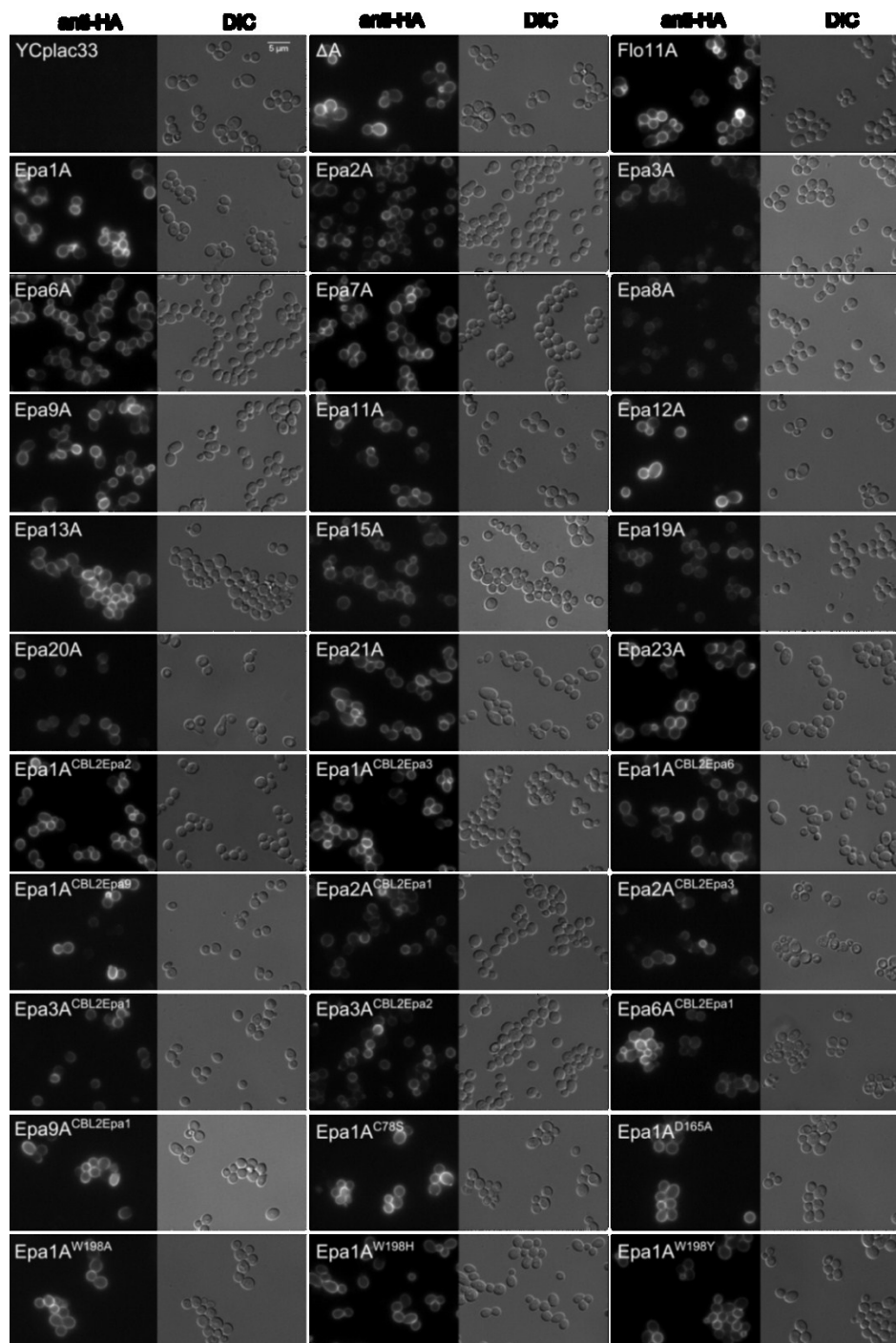


Abbildung 64: Nachweis der EpaA-Domänen auf der Oberfläche von *S. cerevisiae* mittels Immunfluoreszenz.

Fluoreszenz-Mikroskopie (links) sowie die dazugehörigen *Differential interference contrast* (DIC)-Mikroskopie (rechts) mit *S. cerevisiae* Zellen, welche die verschiedenen EpaA-Domänen auf ihrer Oberfläche präsentieren. Mittels eines Antikörpers gegen das HA-Epitop und eines Cy3-gekoppelten sekundären Antikörpers konnten die EpaA-Domänen auf der Oberfläche von des *S. cerevisiae* Stammes S288c nachgewiesen werden. Als Negativkontrolle diente das Leerplasmid YCplac33 (B2445), welches kein HA-Epitop besitzt. Der Größenmaßstab entspricht 5 µm.

Teile der Klonierung, des Nachweises der EpaA-Domänen an der Oberfläche von *S. cerevisiae* und nachfolgende *in vivo* Messungen wurden in Zusammenarbeit mit Lisa Ludewig, Cornelia Hillenbrand und Lisanne Heim im Rahmen von der Bachelor- und Masterarbeiten durchgeführt

5.5.6 Bestimmung der Zellzahl

Mit Hilfe des MultisizerTM 3 Coulter Counters (*Beckmann Coulter*) kann man sowohl die Anzahl als auch die Größe der Zellen verschiedener Organismen bestimmen. Zum Zählen der *S. cerevisiae* Zellen, die die verschiedenen EpaA-Domänen auf ihrer Oberfläche präsentieren, wurde eine Kapillare verwendet, deren Öffnung einen Durchmesser von 100 µm besitzt, die Genauigkeit der Kapillare ist im Größenbereich von 2 – 60 % des Kapillardurchmessers gewährleistet. Die Messungen beruhen auf dem Prinzip der Impedanzmessung. Wenn ein Partikel durch die Kapillaröffnung fließt, ändert sich der Widerstand zwischen den Elektroden, und das Gerät berechnet anhand der Größenordnung der Widerstandsänderung das Volumen und die Anzahl der Partikel. Mit Hilfe der Coulter Counters wurde die Zelldichte aller Hefestämme bei einer OD₆₀₀ von 1,0 ermittelt. Dies lag bei $1,8 \cdot 10^7$ Zellen/ml. Unter Verwendung dieser Angaben ist man in der Lage, eine definierte Anzahl an Zellen für nachfolgende Tests einzusetzen.

5.5.7 Adhäsionstest an Epithelzellen

Die zu untersuchenden Stämme wurden in jeweils 5 ml YPD-Medium angeimpft und über Nacht bei 30 °C schüttelnd inkubiert. Von diesen Vorkulturen wurden am nächsten Tag Hauptkulturen auf eine OD₆₀₀ von 0.3 angeimpft und bei 30 °C schüttelnd inkubiert und in die logarithmische Phase angezogen, bis eine OD₆₀₀ von 0,9 – 1,0 erreicht war. Unter Verwendung der Zellzahl, die bei einer OD₆₀₀ von 1,0 mit Hilfe der Coulter Counters ermittelt wurde, konnten die Kulturen auf etwa 6000 Zellen/ml in DMEM verdünnt werden. 50 µl der jeweiligen Verdünnung wurden anschließend in die Vertiefungen einer 24-Well-Platte pipettiert. In den Vertiefungen dieser Platte wurden zuvor Caco-2 Zellen unter sterilen Bedingungen bei 37 °C und 5 % CO₂ in DMEM für zwei Tage kultiviert, bis sich ein konfluenten Zellverband ausbildete. Die Platten wurden anschließend in unterschiedlichen Zeitintervallen von 0, 30, 60, 120 oder 180 Minuten bei 37 °C unter CO₂-Zufuhr inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Überstand, welcher die nicht-adhäsiven Hefezellen enthielt, abgenommen

und auf YPD-Platten ausplattiert. Um den Anteil der adhäsiven Hefezellen zu bestimmen, wurden die Wells der Platten zunächst mit 300 µl PBS⁻-Puffer gewaschen. Anschließend konnten die adhäsiven Hefezellen zusammen mit den Caco-2 Zellen in 300 µl PBS⁻-Puffer resuspendiert werden. Diese Zellsuspensionen wurden ebenfalls auf YPD-Platten ausplattiert.

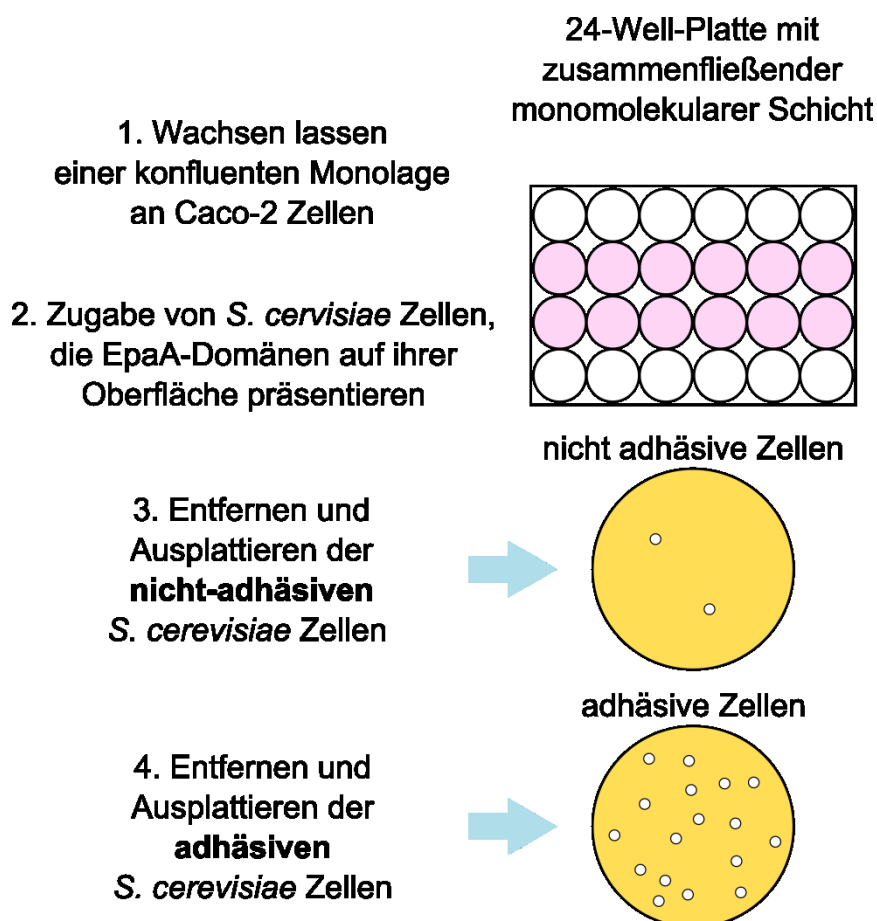


Abbildung 65: Versuchsablauf des Adhäsionstests an Epithelzellen.

24-Well Platte mit Caco-2 Zellen in DMEM (rosa), YPD-Platten (gelb) (Dieterich, *et al.*, 2002).

Nach 2 tägiger Inkubation der Platten bei 30 °C konnte die koloniebildende Einheit (KBE) der nicht-adhäsiven und der adhäsiven Hefezellen bestimmt werden. Die KBE gibt dabei die Anzahl vermehrungsfähiger Hefezellen an, die bei der Kultivierung eine Kolonie ausbilden. Die KBE-Werte konnten mithilfe des aCOLyte Colony Counters 7510 DWS (*Synbiosis*, Camebridge, UK) ermittelt werden. Je nach enthaltenem Plasmid wurden 3 bis 6 unterschiedliche Klone des jeweiligen Epa-oberflächen-exprimierenden Hefestammes getestet, wobei zudem immer ein technisches Replikat erstellt wurde. Die Durchschnittswerte der adhäsiven- und

nicht-adhäsiven Hefezellen wurden anschließend ermittelt, sodass die relative Adhäsion berechnet werden konnte. Dafür wurde folgende Formel verwendet:

$$A = \frac{KBE(adhäsive\ Zellen)}{KBE(adhäsive\ Zellen) + KBE(nicht - adhäsive\ Zellen)} \cdot 100$$

5.5.7.1 Kultivierung adhärenter Caco-2 Zellen

Die adhärenenten Caco-2 Zellen wurden in einem Brutschrank (*Heraeus*) bei einer Temperatur von 37 °C und einer 5 %igen CO₂ Zufuhr in 75 cm² Flaschen aus Kunststoff inkubiert. Als Medium wurde DMEM verwendet, welches zuvor mit 10 % FCS, 1 mM Na-Pyruvat und 1 % Gentamycin versetzt wurde. Ein Mediumwechsel erfolgte bei einem Farbumschlag des Indikators ins Rotorange. Dazu wurde das alte Medium vorsichtig abgesaugt und frisches auf 37 °C erwärmtes Medium auf die Zellen gegeben. Alle verwendeten Puffer und Medien wurden vor der Verwendung auf 37 °C erwärmt. Alle Arbeitsschritte erfolgten an einer Sterilbank. Bei einem fast konfluenten Zellwachstum (70 -90 %) wurden die Zellen verdünnt und in frische 75 cm² Zellkulturflaschen überführt. Dieser Vorgang wird als *Passagieren* bezeichnet. Dabei wurde zunächst vorsichtig das alte Medium entfernt. Die Zellschicht wurde anschließend vorsichtig mit 10 ml PBS⁻-Puffer gewaschen. Danach wurde 1 ml Trypsin auf die Zellen gegeben. Es erfolgte eine 1 -2 minütige Inkubation im CO₂-Schränk, bis sich die adhärenenten Caco-2 Zellen vom Flaschenboden lösten. Daraufhin wurden direkt 9 ml DMEM hinzugefügt und die Zellen durch vorsichtiges Pipettieren vollständig vom Flaschenboden gelöst und durchmischt. Die Zellen wurden anschließend mittels Homozytometer gezählt und auf 1,0 oder 1,5 · 10⁶ Zellen in 10 ml frischem DMEM verdünnt, in neue Zellkulturflaschen umgesetzt und für 2 -3 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Vor Beginn des Adhäsionstests mit Caco-2 Zellen sollten diese etwa 20 *Passagen* durchlaufen haben.

5.5.7.2 Aussähen in 24-well Platte

Hierzu wurde zunächst eine fast konfluent mit Caco-2 Zellen bewachsene Zellkulturflasche genommen. Das alte Medium wurde abgesaugt und die Monolage mit PBS⁻-Puffer gewaschen. Auch die Ablösung der konfluenten Monolage und das Stoppen des Zellwachstums mit 1 ml Trypsin sowie das Ablösen und Durchmischen der Zellen mit 9 ml DMEM erfolgte wie bereits beschrieben. 5 ml der resuspendierten

Zellen wurden anschließend mit 25 ml DMEM versetzt und durchmischt. Mit dieser Zellsuspension wurden je zwei Reihen der 24-Well-Platten mit 500 µl und zwei Reihen mit 700 µl versetzt. Dadurch wurde sichergestellt, dass nach der folgenden eintägigen Inkubation der Platten bei 37 °C und 5 % CO₂-Zufuhr mindestens zwei Reihen der Platten konfluent bewachsen waren. Pro Zeitpunkt (0, 30, 60, 120 oder 180 Minuten) wurde eine 24-Well-Platte benötigt. Direkt vor Beginn des Adhäsionstest wurde das Medium aus den jeweiligen Vertiefungen entfernt und durch 250 µl an frisches DMEM-Medium ohne Gentamycin ersetzt.

5.5.7.3 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Für das Einfrieren von Zellen wurden die Zellen von drei konfluent bewachsener 75 cm² Kulturflaschen mit Medium gewaschen, abtrysiniert und in 10 ml frischem DMEM-Medium aufgenommen. Die Zellen wurden anschließend bei 800 rpm in einer Heraeus Varifuge 3.0R für 4 Minuten zentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden danach in 5 ml einer Mischung aus 3,5 ml DMEM, 1 ml FCS und 0,5 ml DMSO vorsichtig resuspendiert und gleichmäßig auf fünf Kryoröhrchen verteilt und für drei Tage bei -20 °C eingefroren. Nach diesen drei Tagen erfolgte die Lagerung der Zellen in flüssigem Stickstoff.

Für das Auftauen der eingefrorenen Zellen wurde ein Kryoröhrchen aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und sofort in 37 °C warmes Wasser gestellt. Die im Schutzgefäß aufgetaute Zellsuspension wurde anschließend in eine 75 cm² Kulturflasche überführt und mit frischem, auf 37 °C erwärmtem Medium auf 10 ml aufgefüllt und bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

5.5.8 Adhäsionstest an Polystyrol

Jeweils 5 ml SC-Ura-Flüssigmedium, versetzt mit 2% Glukose, wurde mit den zu untersuchenden Stämmen angeimpft und über Nacht bei 30 °C schüttelnd inkubiert. Am nächsten Tag wurde von der Übernachtskultur eine Hauptkultur auf eine OD₆₀₀ von 0.3 angeimpft und schüttelnd bei 30 °C inkubiert, bis eine OD₆₀₀ 0.7 – 0.8 erreicht war. Die Zellen wurden nach etwa 4 Stunden für 3 Minuten bei 2000 rpm abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde zunächst in 10 ml H₂O gewaschen und anschließend in SC-Ura-Flüssigmedium mit 0.5 % Glukose aufgenommen, wobei eine OD₆₀₀ von 0.7 eingestellt wurde. Je 300 µl der Zellsuspensionen wurden danach in die Vertiefungen

einer 48-Well-Platte pipettiert und für 3 Stunden bei 30 °C inkubiert. Zum Anfärben der Zellen wurden 30 µl Kristallviolettlösung (1% (w/v)) in die Vertiefungen gegeben. Die Platte wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in einem Wasserbad gewaschen. Die nicht-adhäsiven Zellen und der überschüssige Farbstoff wurden so entfernt und die Platten konnten über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet werden. Am nächsten Tag wurden die adhäsiven Zellen in 600 µl einer 1 %igen SDS-Lösung resuspendiert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Platte für 2 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert. 30 µl des Überstandes wurden in die Vertiefungen einer 96-Well-Platte pipettiert und mit 320 µl destilliertem Wassers verdünnt. Daraufhin wurde die Absorption der Proben bei 562 nm mit dem Microplate Reader 680 (*Bio-Rad*) gemessen (O'Toole, *et al.*, 1999). Es wurden 3 verschiedene Kolonien von jedem Hefestamm getestet. Außerdem wurden von jeder Kolonie 4 technische Replikate erstellt, sodass die Durchschnittswerte berechnet werden konnten. Die absolute Absorption des destillierten Wassers (Blindwert) wurde von allen Werten abgezogen. Der Absorptionswert der Positivkontrolle wurde auf eine Bindung gleich 100 % gesetzt und die Adhäsionen die durch die EpaA-Domänen vermittelt wurden, wurden auf diesen Wert normiert.

5.5.9 Adhäsionstest auf Agar

Die zu testenden Stämme wurden auf YPD-, YNB-, SC-Ura-Festmedium, mit und ohne Galactose-Supplementation, ausgestrichen und für 5 Tage bei 30 °C inkubiert. Um die Adhäsion an Agar zu untersuchen, wurden die Platten zunächst vorsichtig und gleichmäßig mit einem sanften Wasserstrahl abgespült. Es folgte ein zweiter Waschgang, bei dem die Platten mit einem stärkeren Strahl behandelt wurden. Bei diesem Waschtest blieben die adhäsiven Stämme am Agar haften, während die nicht-adhäsiven Stämme abgespült wurden. Um das Bindungsverhalten der Stämme zu veranschaulichen, wurden vor und nach dem Waschen Fotos gemacht. Die Adhäsionstests wurden insgesamt dreimal mit verschiedenen Kolonien wiederholt.

Epa6: K26-S271

<u>10</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>
MGSSHHHHH	SSGLVPRGSH	MKDDYSSSL	NNNLGWTDP	EFPLGCSPNV	TTPKNGLSME
<u>70</u>	<u>80</u>	<u>90</u>	<u>100</u>	<u>110</u>	<u>120</u>
LYSYDYLKSG	SNPCWDAAYL	DPNYPRTGYK	SHRLLAKVEN	VAGNINFYYH	APMGCTSLFD
<u>130</u>	<u>140</u>	<u>150</u>	<u>160</u>	<u>170</u>	<u>180</u>
TLPQAYNYRT	PLTMTNFTML	LYGYFKPKVT	GYHTFTISAD	DLLFVNFGAG	NAFDCKKRES
<u>190</u>	<u>200</u>	<u>210</u>	<u>220</u>	<u>230</u>	<u>240</u>
SADDFGNYQA	YAVWGSQTAK	DDLTVHLDAG	LYYPIRIFFN	NRDNDGALS	TLKTESDPNP
<u>250</u>	<u>260</u>				
VIDFSDFYS	FDDTKDGCPG	LVSYDTS			

Epa7: K26-S271

<u>10</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>
MGSSHHHHH	SSGLVPRGSH	MKDDYSSFLS	NNNLGWTDP	EFPLGCSPNV	TTPKNGLSME
<u>70</u>	<u>80</u>	<u>90</u>	<u>100</u>	<u>110</u>	<u>120</u>
LYSYDLRKNG	SYPCWDAAYL	DPNYPRTGYK	SHRLLAKVDG	VTGNINFYYH	ATKCTPEID
<u>130</u>	<u>140</u>	<u>150</u>	<u>160</u>	<u>170</u>	<u>180</u>
HLPASYNYPK	PLTMTNFTML	LYGYFKPKVT	GYHTFTISAD	DLLFVNFGAG	NAFDCKKRES
<u>190</u>	<u>200</u>	<u>210</u>	<u>220</u>	<u>230</u>	<u>240</u>
SADDFGNYQA	YAVWGSQTAK	DDLTVHLDAG	LYYPIRIFFN	NREYDAELSL	TLKTESDSNP
<u>250</u>	<u>260</u>				
VIDFSDFYS	FDDTKDGCPG	LVSYDTS			

Epa8: S36-I259

<u>10</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>
MGSSHHHHH	SSGLVPRGSH	MASSRALSDY	PLGCSPLLGT	KLTPGLSMEL	YEYPLDNHGI
<u>70</u>	<u>80</u>	<u>90</u>	<u>100</u>	<u>110</u>	<u>120</u>
GPHCWDPAYL	NPEYPRTGFE	SHKLIGTAQN	VMSLNFEHRT	QDCHVEFSNL	PASFNFPDQI
<u>130</u>	<u>140</u>	<u>150</u>	<u>160</u>	<u>170</u>	<u>180</u>
TLTNFTMLLY	GYFKPKESGR	YRFHMEADDL	LLMNLGAGNA	FDCCAHEATR	NNLGDYIAYD
<u>190</u>	<u>200</u>	<u>210</u>	<u>220</u>	<u>230</u>	<u>240</u>
IWAGTRKDVE	VFLEKEVFYP	LRLFFNNRDG	RAALDFSYYL	NGATEPGTDI	PELLFSLPDG
ESCPAYI					

Epa9: D39-D305

10	20	30	40	50	60
MGSSHHHHHH	SSGLVPRGSH	MASDITPFAH	YPRPEGCSSP	PNAVSVGLHM	DLYNYPYLYV
70	80	90	100	110	120
KNPRTGFTND	TDSADGETD	GDSAGGIEGR	AGQCWNPEYQ	DPNFPRYGYK	KYGSFGSSDH
130	140	150	160	170	180
VNGKISWDHN	EFKEGCKPIM	ARLPTAYNYP	AKITFSNFTM	VLSGYFKPKS	TGLYKFEIHA
190	200	210	220	230	240
DDFILFNFGS	KNAFECCNRE	ESIDNFGPYV	AYAMWPNEAD	QELEVYLFED	SYYPIRLFYN
250	260	270	280	290	
NRDYHSKFMV	GFYPNTEEI	TYDFDGYLYM	LDDTGNECKD	SIRYKTVCDD	

Epa10: D39-D306

10	20	30	40	50	60
MGSSHHHHHH	SSGLVPRGSH	MDFTPFAHYF	RPEGCSSPPN	SVSVGLHMNL	YNYPYLYVKP
70	80	90	100	110	120
STKGMFTNDT	NSDSDGETDG	DSAGGIEGRA	GQCWNPEYQD	PNFPRFGYKQ	YGEFGASDNV
130	140	150	160	170	180
NGDISWDHNE	FTEGCKPVLA	ALPPGYNYPD	EITFSNFTMV	LSGYFKPKTS	GVYKFELKAD
190	200	210	220	230	240
DFILFNFGAK	NAFECCNREE	SIDNFGPYVA	YAMWPNQADQ	ELEVYLFEDS	YYPLRLFYNN
250	260	270	280		
RDYHSKFKIG	FYPQGTTIT	FDFDGYLFML	DDTGNECRDS	IRYRTVCDD	

Epa11: S33-I254

10	20	30	40	50	60
MGSSHHHHHH	SSGLVPRGSH	MSNAPNYPVG	CSPSVGTQLT	PGLSLEVYAY	PMDGNNGYCW
70	80	90	100	110	120
NATYKDPEFP	RSGYLKNKLL	GKADGVVGPL	NFLAKNKDCS	PKVDTL PAGF	NFPQPITVTN
130	140	150	160	170	180
FTMVLFGYLA	PKQSGKYTFK	LLADDLLLLN	LGATNAFDCC	NREATKNNLG	EFLAYNLWPN
190	200	210	220	230	240
QDKNVTVYLE	KGVYYPLRLF	FNNRDGGSQ L	DFSYYFNDSP	APLTDFSGMF	FSVPDGA ECP

ARI

Epa12: L26-E292

<u>10</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>
MGSSHHHHH	SSGLVPRGSH	MLEPDNSLQI	FDSFLSNPSK	YPLGCSPKIT	NPKKGLSMEL
<u>70</u>	<u>80</u>	<u>90</u>	<u>100</u>	<u>110</u>	<u>120</u>
YSYPYRKKGS	HPCWDPAYLD	PNFPRVGYKK	NKLIARVDGV	SGDINFNFHP	KRQCTPIADY
<u>130</u>	<u>140</u>	<u>150</u>	<u>160</u>	<u>170</u>	<u>180</u>
LPPNFNYNEP	ITTTNFTMLL	YGYFKPKVTG	LHTFDISADD	LLFMNFGAGN	AFDCCRRDST
<u>190</u>	<u>200</u>	<u>210</u>	<u>220</u>	<u>230</u>	<u>240</u>
ADTFGNVAV	AIWGRRIVRN	KLTVRLDKGI	YYPLRLFFNN	RDYYGQMRLT	FKTEHGSERI
<u>250</u>	<u>260</u>	<u>270</u>	<u>280</u>		
TDFSDYFFSV	DDTSEGCPGL	ITYESECADV	KSSTVLETDY	ITIQAEKE	

Epa13: D30-I252

<u>10</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>
MGSSHHHHH	SSGLVPRGSH	MDSSENGYAH	GCSPSIRAKL	KPGLSMEIYS	YALRPTDDHC
<u>70</u>	<u>80</u>	<u>90</u>	<u>100</u>	<u>110</u>	<u>120</u>
WDSAYLDPMF	PRTGYLTHKL	LGKAEIGIIP	LNFLAKNPAC	IPAVSTLPLA	FHFPKPFTIT
<u>130</u>	<u>140</u>	<u>150</u>	<u>160</u>	<u>170</u>	<u>180</u>
NFTMLLYGYL	SPKKTGKYTF	KLLADDLLLM	NFGADNAFDC	CSHDATKDNI	GEYVAYSVPW
<u>190</u>	<u>200</u>	<u>210</u>	<u>220</u>	<u>230</u>	<u>240</u>
GVNKNVTVYL	ESGIYYPLRL	FFNNRDAIAQ	LDFAYYFNDS	PIRQTDfSGM	FFSIPDSVKC

PANI

Epa15: D41-I265

<u>10</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>
MGSSHHHHH	SSGLVPRGSH	MDPTTFPLGC	SPEFTKTKKG	LSMELYRYDY	LPPGSYPCWD
<u>70</u>	<u>80</u>	<u>90</u>	<u>100</u>	<u>110</u>	<u>120</u>
SAYLNPSYPR	TGYKAKKLIA	TVDGVSGDIN	FKFNPKEGCK	AIPDYLPSTF	NYHEPITITN
<u>130</u>	<u>140</u>	<u>150</u>	<u>160</u>	<u>170</u>	<u>180</u>
FTMILYGYFM	PKTTAFHTFY	VTADDLLFMN	FGAGNAFDCC	RREETADKFG	NYAAYS VWGK
<u>190</u>	<u>200</u>	<u>210</u>	<u>220</u>	<u>230</u>	<u>240</u>
KSLKNELTVY	LHTGVYYPPIR	LFYNNRDYIA	QLDIRFKTEH	SNAIITNFTD	YFYSVDDSSL

GCPGLI

Epa19: S34-V256

10	20	30	40	50	60
MGSSHHHHHH	SSGLVPRGSH	MSKDPTRFPI	GCSPQVLKTQ	PGLAVKLYSY	GHPVPGCSYI
70	80	90	100	110	120
TYQYPDFPRS	GYKKERKLAD	ITGVNGKIDI	DLKPNDPCR̄V	LTGHLPSNYN	YPDTLTYTN̄F
130	140	150	160	170	180
TMILYGYFQP	KVTGYHTFNL	EADDLLFMNL	GAGNAFDCCK	AESTLDNFGN	YQSYSLWGSD
190	200	210	220	230	240
YAKANITVFL	VSGVYYPIRL	FYVNRDNNAV	IDFSFTTEFD	KEKVHDFTSY	FFSASDGEQC

PGSV

Epa20: S33-V279

10	20	30	40	50	60
MGSSHHHHHH	SSGLVPRGSH	MASSNIPNNY	PLGCSNKYSG	HLPGLKMELY	SYNYVNPRHP
70	80	90	100	110	120
DPQNPQKLDQ	LYDPNLLGT̄Y	ECFDSSYKDI	NYPRVGYKSK	TLIGRSDGVS	GILNFN̄FVPP
130	140	150	160	170	180
WGCM̄PQKGQL	PPAYNFKSNI	TLSNFTMILF	GYFKPKISGN	HIFSLHGDDL	IYLN̄FGAGNA
190	200	210	220	230	240
FDCCRQESSA	DNFGNYQAFS	LWGINWEKKT	LTVYLD̄MNTY	YPIRIFYN̄NR	DYQAIF̄NFSF
250	260	270			
KTEFDSSPVI	DFQDYFFFLR	DIDGGCPGEV			

Epa21: T31-I255

10	20	30	40	50	60
MGSSHHHHHH	SSGLVPRGSH	MASTPNIESH	PQGCSPVDT̄S	GIKPGLKMDL	YRFPITPPGT
70	80	90	100	110	120
GCWSWDWLT̄V	TPDFPRSGȲW	KWPKIAEVDG	VVGPLHLDSG	HPTCDPLTSV	LPHGF̄NYLQS
130	140	150	160	170	180
ITTTNFT̄MVL	HGYFVPKQSG	KYT̄FEFKADD	ALL̄LNLGAGN	AFSCCDYN̄NS	QYNQGEYL̄AY
190	200	210	220	230	240
AIWSKNNQT̄A	TLYLEKGIȲY	PIRVFYHNRC	CGAYMDV̄VYY	FNDSP̄IPNRD	FSGL̄LFSIPD

SDSCDANI

Epa22: K28-K266

<u>10</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>
MGSSHHHHH	SSGLVPRGSH	MKRALSSQNP	FGYPIGCSPQ	STNVIPGLTM	ELYSYPIVSG
<u>70</u>	<u>80</u>	<u>90</u>	<u>100</u>	<u>110</u>	<u>120</u>
TPPNCYDASY	VDPEYPRTGY	LKRKMIGKST	GVTGSLNYKF	SVEKACMVKY	GNLPAGYNYN
<u>130</u>	<u>140</u>	<u>150</u>	<u>160</u>	<u>170</u>	<u>180</u>
EPLTVSNFTM	LLYGYFKPQT	SGIHTFFVNA	DDLLYINFGA	GNAFDCCKRE	DSKFKLGEYV
<u>190</u>	<u>200</u>	<u>210</u>	<u>220</u>	<u>230</u>	<u>240</u>
AYDIWHVDSS	KNKVSLNLEK	DVYYPIRMFF	NNIGKDSSLD	LSFSVNGAVE	HITDFSGYLY
<u>250</u>	<u>260</u>				
SVPDQPDACP	APIGYDTTCK				

Epa23: I22-G279

<u>10</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>
MGSSHHHHH	SSGLVPRGSH	MIPNPFEGTI	NNFPSCGSPN	HGLYNRGLTM	ELYNYSYIHP
<u>70</u>	<u>80</u>	<u>90</u>	<u>100</u>	<u>110</u>	<u>120</u>
QSIQSYFNTS	TLKKMEKGQC	WDPSYLDVNY	PRTGYKTHNR	FAKVNGIDGI	LDFEFNPTRS
<u>130</u>	<u>140</u>	<u>150</u>	<u>160</u>	<u>170</u>	<u>180</u>
CVPSKGQLPQ	NYNYPLQFTL	SNFTMLLYGY	FKPKVTAKHT	FTIFADDLLF	LNFGAGNAFD
<u>190</u>	<u>200</u>	<u>210</u>	<u>220</u>	<u>230</u>	<u>240</u>
CCQQQDTIDD	FGNYQAYALW	GSDTQQNTLT	VNLDANIYYP	IRMFYNNRDF	KGALNMYFTT
<u>250</u>	<u>260</u>	<u>270</u>			
DESNTKINDF	SGYLFNIPDS	SEGCPAHISY	ETECGNVSG		

Epa1^{CBL2Epa9}: T31-S271

<u>10</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>
MGSSHHHHH	SSGLVPRGSH	MTSSNDISLA	SKDPTTFPLG	CSPDITTPKK	GLSMELYSYD
<u>70</u>	<u>80</u>	<u>90</u>	<u>100</u>	<u>110</u>	<u>120</u>
FRKKGSYPCW	DAAYLDPNYP	RTGYKSHRLL	AKVDGVTGNI	NFYHATKGC	TPQLGHLFAS
<u>130</u>	<u>140</u>	<u>150</u>	<u>160</u>	<u>170</u>	<u>180</u>
YNYPKPLTMT	NFTMLLYGYF	RPKVTGFHTF	TISADDLLFV	NFGAGNAFDC	CRRDSSADHF
<u>190</u>	<u>200</u>	<u>210</u>	<u>220</u>	<u>230</u>	<u>240</u>
GNYQAYAIWG	SKTAKDELTV	HLDAGVYYP	RLFYNNRDYH	GALSFTFKTE	SNENTVSDFS
<u>250</u>	<u>260</u>				
EYFFSLDDTE	EGCPGLISYD	SS			

Epa2^{CBL2Epa1} : P32-C262

10 20 30 40 50 60
 MGSSHHHHHH SSGLVPRGSH MPKSKDPTSF PMGCSPQVLK TQPGLAVKLY SYGHPVPGCA
 70 80 90 100 110 120
 YNTYQYPDFP RSGYKKERKL ADITGVNGRI DIDLKPNDPC RVLSGNLPSN YNYQNTLTYT
 130 140 150 160 170 180
 NFTMILYGYF QPKVTGYHTF NLEADDLLFM NLGAGNAFDC CRAESTLDNF GNYQSYSIWG
 190 200 210 220 230 240
 TDKATADLTV FLVSGIYYPI RLFYVNREYD AVLDFSFSSTE FNKEIIHDFT SYFFSASDEE
 250
 QCPGNINYN Y HC

Epa2^{CBL2Epa3} : P32-C262

10 20 30 40 50 60
 MGSSHHHHHH SSGLVPRGSH MPKSKDPTSF PMGCSPQVLK TQPGLAVKLY SYGHPVPGCA
 70 80 90 100 110 120
 YNTYQYPDFP RSGYKKERKL ADITGVNGRI DIDLKPNDPC RVLSGNLPSN YNYQNTLTYT
 130 140 150 160 170 180
 NFTMILYGYF QPKVTGYHTF NLEADDLLFM NLGAGNAFDC CRAESTLDNF GNYQSYSIWG
 190 200 210 220 230 240
 TDKATADLTV FLVSGIYYPI RLFYVNIKGD AVLDFSFSSTE FNKEIIHDFT SYFFSASDEE
 250
 QCPGNINYN Y HC

Epa3^{CBL2Epa1} : K28-R226

10 20 30 40 50 60
 MGSSHHHHHH SSGLVPRGSH MKRELSSQNP FGYPICGSPQ DVAIIPGLTM ELYSYPIVSG
 70 80 90 100 110 120
 TPPNCYDASY VDPEYPRTGY LKRKMVGKST GVTGNLNYKY SVEKACMVKY GNLPAAGYNYN
 130 140 150 160 170 180
 EPLTVSNFTM ILYGYFKAQT TGLHTFFVNA DDLLYINFGA GNAFDCCKRE DSKTKLGEYV
 190 200 210 220 230 240
 AYDIWHVDSS KKNVSLFLEK DLYYPIRMFF NNREYDSSLD LSFSVNGATD QISDFSGYLY
 250 260
 SVPDQPDTCF AHIGYDTTCR

Epa3^{CBL2Epa2}: K28-R226

10	20	30	40	50	60
MGSSHHHHH	SSGLVPRGSH	MKRELSSQNP	FGYPIGCSPQ	DVAIIPGLTM	ELYSYPIVSG
70	80	90	100	110	120
TPPNCYDASY	VDPEYPRTGY	LKRKMVGKST	GVTGNLNYKY	SVEKACMVKY	GNLPAGYNYN
130	140	150	160	170	180
EPLTVSNFTM	ILYGYFKAQT	TGLHTFFVNA	DDLLYINFGA	GNAFDCCKRE	DSKTKLGEYV
190	200	210	220	230	240
AYDIWHVDSS	KNKVSLEFLEK	DLYYPIRMFF	NNRDNNSSLD	LSFSVNGATD	QISDFSGYLY
250	260				
SVPDQPDTCF	AHIGYDTTCR				

Epa6^{CBL2Epa1}: K26-S271

10	20	30	40	50	60
MGSSHHHHH	SSGLVPRGSH	MKDDYSSSL	NNNLGWTDP	EFPLGCSPNV	TTPKNGLSME
70	80	90	100	110	120
LYSYDYLKSG	SNPCWDAAYL	DPNYPRTGYK	SHRLLAKVEN	VAGNINFYYH	APMGCTSLFD
130	140	150	160	170	180
TLPQAYNYRT	PLTMTNFTML	LYGYFKPKVT	GYHTFTISAD	DLLFVNFGAG	NAFDCCKRES
190	200	210	220	230	240
SADDFGNYQA	YAVWGSQTAK	DDLTVHLDAG	LYYPRIFFN	NREYDGALSL	TLKTESDPNP
250	260				
VIDFSDYFYS	FDDTKDGCPG	LVSYDTS			

Epa9^{CBL2Epa1}: D39-D305

10	20	30	40	50	60
MGSSHHHHH	SSGLVPRGSH	MASDITPFAH	YPRPEGCSSP	PNAVSVGLHM	DLYNYPYLYV
70	80	90	100	110	120
KNPRTGFTND	TDSDADGETD	GDSAGGIEGR	AGQCWNPEYQ	DPNFPRYGYK	KYGSFGSSDH
130	140	150	160	170	180
VNGKISWDHN	EFKEGCKPIM	ARLPTAYNYP	AKITFSNFTM	VLSGYFKPKS	TGLYKFEIHA
190	200	210	220	230	240
DDFILFNFGS	KNAFECCNRE	ESIDNFGPYV	AYAMWPNEAD	QELEVYLFED	SYYPIRLFYN
250	260	270	280	290	
NREYDSKFMV	GFYPPNTEEI	TYDFDGYLYM	LDDTGNECKD	SIRYKTVCD	

6.2 UniProt- und Gen-ID

Tabelle 40: UniProt- und Gen-ID der EpaA-Domänen

Protein	UniProt-ID	Gen-ID
Epa1A	Q6VBJ0	CAGL0E06644g
Epa2A	Q6VBI9	CAGL0E06666g
Epa3A	Q6VBI8	CAGL0E06688g
Epa6A	Q6DTM7	CAGL0C00110g
Epa7A	Q6DTM6	CAGL0C05643g
Epa8A	Q6FX25	CAGL0C00847g
Epa9A	B4UMX2	CAGL0A01366g
Epa10A	B4UMX0	CAGL0A01284g
Epa11A	B4UN55	CAGL0L13299g
Epa12A	Q6FK94	CAGL0M00132g
Epa13A	Q6FK96	CAGL0L13332g
Epa15A	Q6FNG2	CAGL0J11968g
Epa19A		CAGL0A00110g
Epa20A	Q6FVP4	CAGL0E00275g
Epa21A		CAGL0D06732g
Epa22A	B4UN33	CAGL0K00170g
Epa23A	Q6FR82	CAGL0I00220g

6.3 Sequenzidentität

Tabelle 41: Sequenzidentitäten der EpaA-Domänen

Epa	1	2	3	6	7	8	9	10	11	12	13	15	19	20	21	22	23
1	100	55	47	79	84	45	42	43	45	67	47	64	55	52	38	47	56
2	55	100	44	51	51	43	38	38	43	51	43	54	89	46	42	43	47
3	47	44	100	47	49	46	38	38	49	46	44	45	42	42	40	91	44
6	79	51	47	100	90	44	42	41	43	64	46	60	52	52	37	47	56
7	84	51	49	90	100	44	41	41	45	64	46	61	53	52	38	48	54
8	45	43	46	44	44	100	34	37	57	48	53	44	42	39	42	48	40
9	42	38	38	42	41	34	100	85	40	43	34	43	38	40	38	38	40
10	43	38	38	41	41	37	85	100	43	43	35	43	38	40	39	39	40
11	45	43	49	43	45	57	40	43	100	47	65	45	44	42	50	49	42
12	67	51	46	64	64	48	43	43	47	100	50	67	48	52	41	49	53
13	47	43	44	46	46	53	34	35	65	50	100	48	42	41	47	44	46
15	64	54	45	60	61	44	43	43	45	67	48	100	52	52	40	47	52
19	55	89	42	52	53	42	38	38	44	48	42	52	100	47	40	42	45
20	52	46	42	52	52	39	40	40	42	52	41	52	47	100	38	43	47
21	38	42	40	37	38	42	38	39	50	41	47	40	40	38	100	41	40
22	47	43	91	47	48	48	38	39	49	49	44	47	42	43	41	100	45
23	56	47	44	56	54	40	40	40	42	53	46	52	45	47	40	45	100

6.4 Schmelzkurven

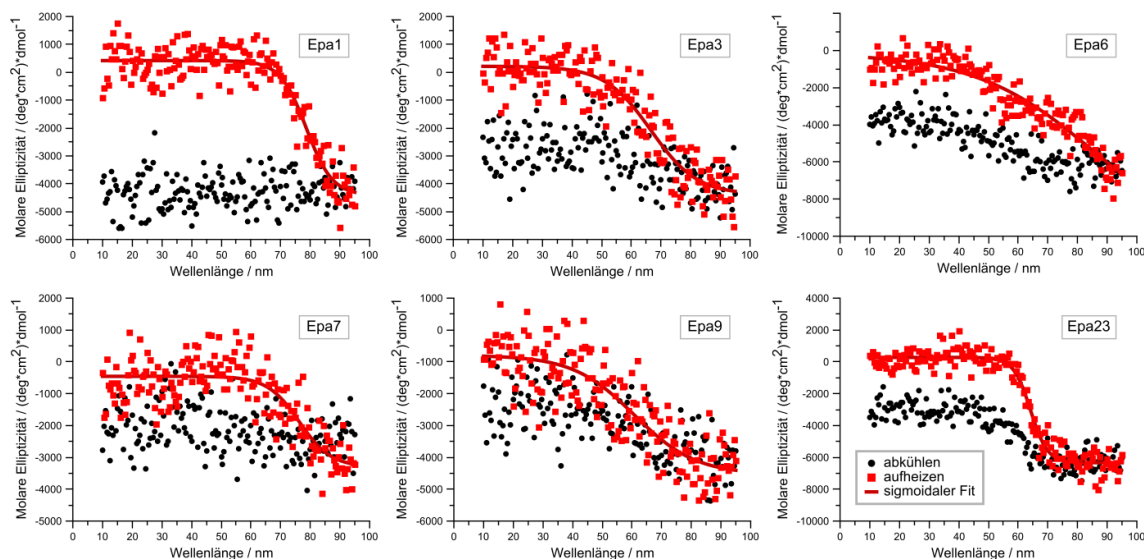


Abbildung 66: Schmelzkurven von Epa1A, Epa3A, Epa6A, Epa7A, Epa9A und Epa23A.

Die Spektren wurden in 10 mM Carbonat-Puffer (pH 8.3), bei einer definierten Wellenlänge und in einem Temperaturbereich von 10 – 95 °C aufgenommen. Die Schmelzkurve ist in Rot dargestellt und die beim Abkühlen aufgenommenen Datenpunkte sind in Schwarz abgebildet.

6.5 CFG-Requests

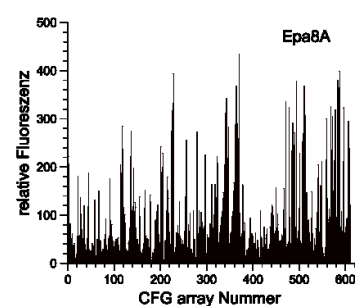
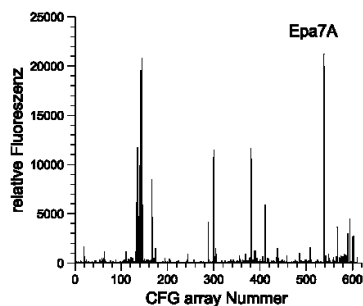
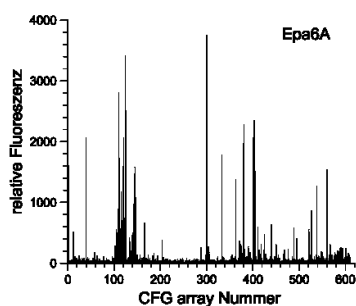
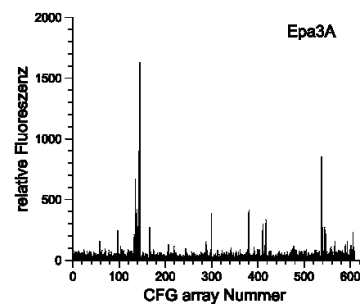
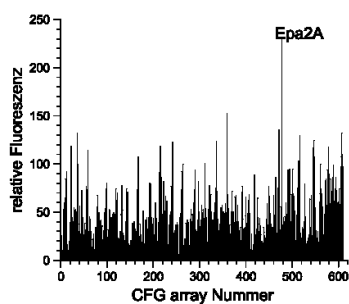
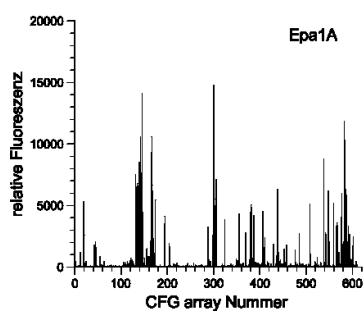
Mit dem vom *Consortium For functional Glycomics* (CFG, www.functionalglycomics.org) angebotenen *Glycan array screening* konnten 610 verschiedene Polyglykane als mögliche Liganden getestet werden. Die verschiedenen Kohlenhydrate und ihre Position auf dem in dieser Arbeit verwendeten Glykan-Chip *Mammalian Printed Array version 5.1* können im Internet unter folgender Adresse betrachtet werden:

<http://www.functionalglycomics.org/static/consortium/resources/resourcecoreh8.shtml>

Zum Vermessen der Spezifitätsprofile der untersuchten EpaA-Domänen wurde mehrere Anträge gestellt. Die Daten sind auf der Homepage des CFGs hinterlegt und können von dort heruntergeladen werden.

Tabelle 42: Antragsnummern der vermessenen Proteine.

Protein	Antragsnummer
Epa1A	cfg_rRequest_2645
Epa2A	cfg_rRequest_2794
Epa3A	cfg_rRequest_2554
Epa6A	cfg_rRequest_2554
Epa7A	cfg_rRequest_2554
Epa8A	cfg_rRequest_2794
Epa9A	cfg_rRequest_2794
Epa10A	cfg_rRequest_2854
Epa11A	cfg_rRequest_2794
Epa12A	cfg_rRequest_2645
Epa13A	cfg_rRequest_2737
Epa15A	cfg_rRequest_2794
Epa19A	cfg_rRequest_2794
Epa20A	cfg_rRequest_2794
Epa21A	cfg_rRequest_2794
Epa22A	cfg_rRequest_2854
Epa23A	cfg_rRequest_2645
Epa1A ^{CBL2Epa9}	cfg_rRequest_2645
Epa3A ^{CBL2Epa1}	cfg_rRequest_2645
Epa3A ^{CBL2Epa2}	cfg_rRequest_2645
Epa9A ^{CBL2Epa1}	cfg_rRequest_2854



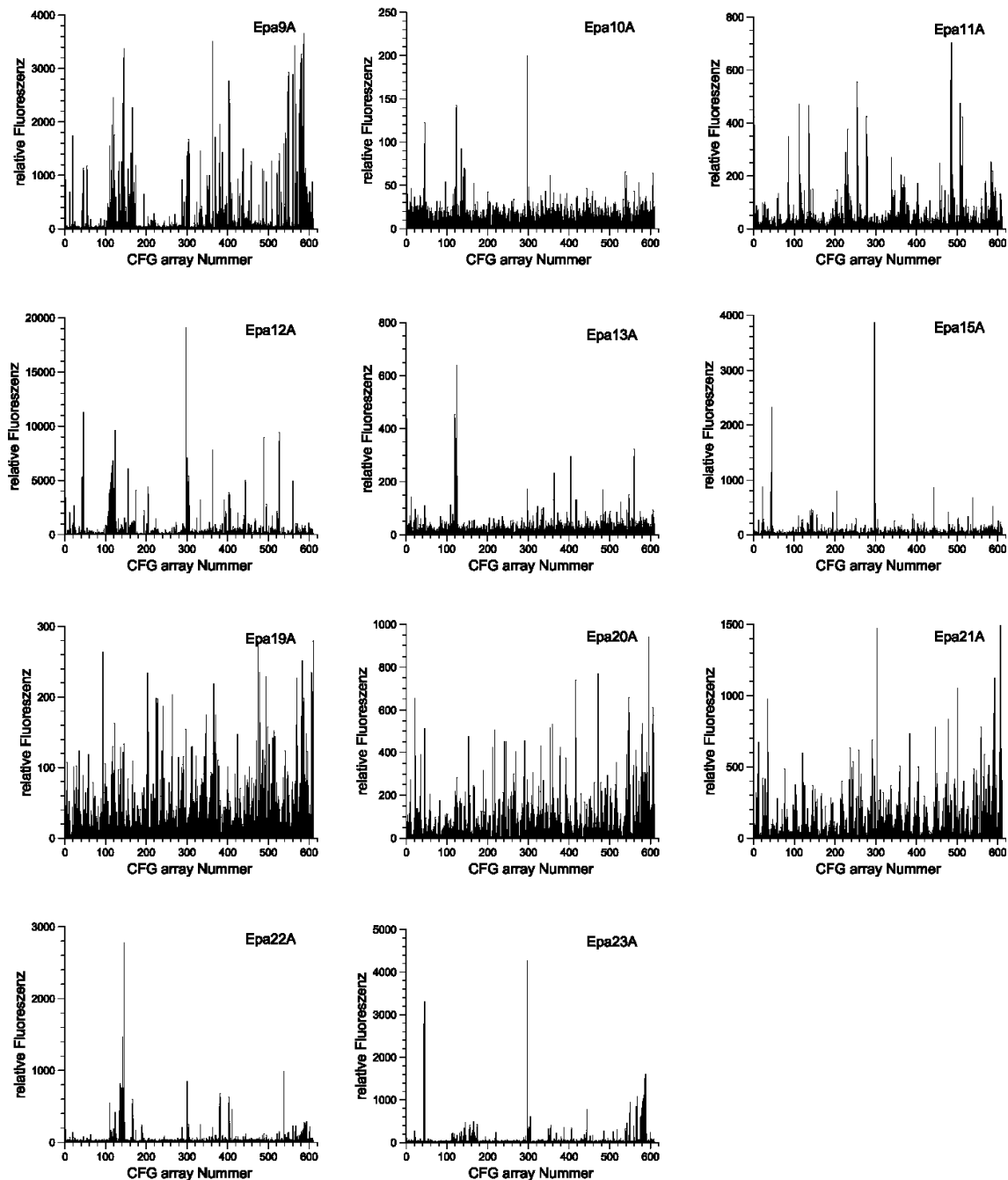


Abbildung 67: Bindungsspezifitätsprofile der EpaA-Domänen.

Es wurde der Glykan-Chip MPA V5.1 verwendet. Dieser Chip präsentiert 610 verschiedene putative Glykanliganden. Die CFG array Nummern stellen die Identifikationsnummern der verschiedenen Glykane dar, die auf jedem Chip in der gleichen Reihenfolge angeordnet und im Anhang 6.5 aufgeführt sind. Alle Profile wurden bei einer Proteinkonzentration von 200 µg/ml aufgenommen. Die Bindungsaffinität zu den einzelnen Glykanen spiegelt sich in den verschiedenen Fluoreszenzintensitäten (relativen Fluoreszenz / RFU) wider.

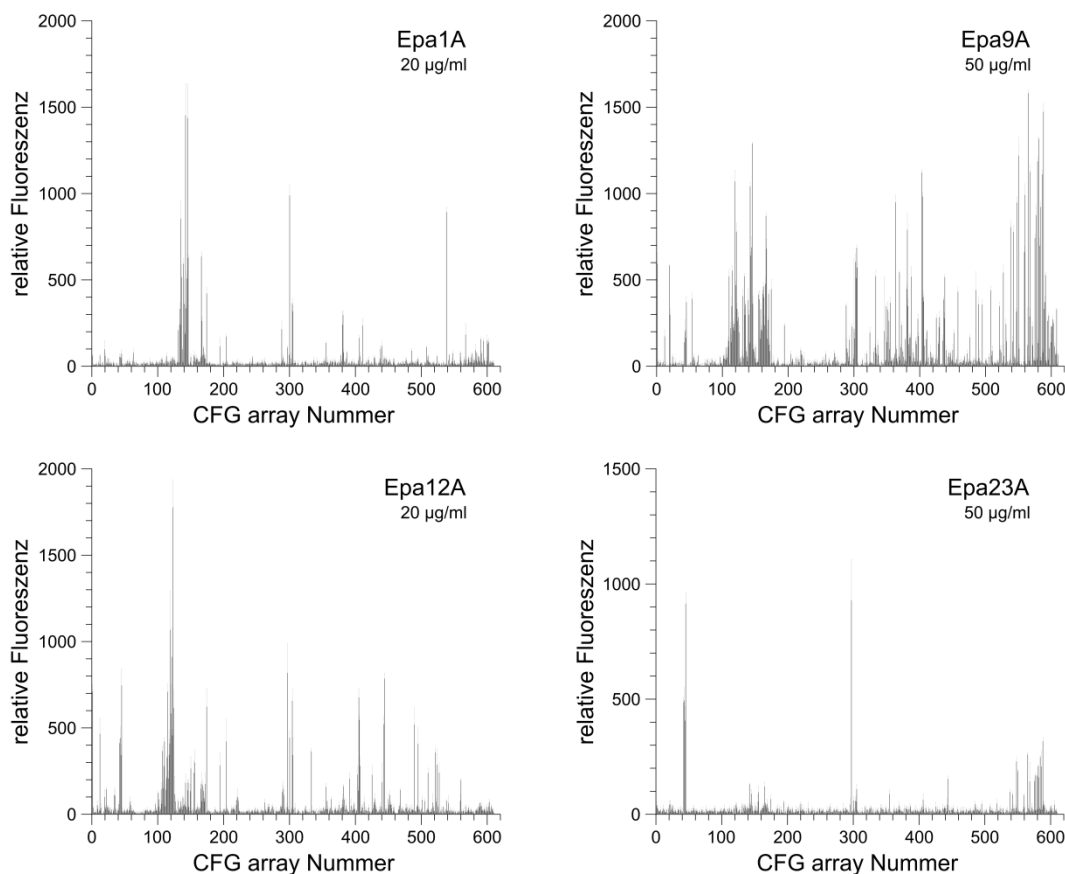


Abbildung 68: Bindungsspezifitätsprofile der A-Domänen von Epa1, Epa9, Epa12 und Epa23 bei verschiedenen Proteinkonzentrationen.

Es wurde der Glykan-Chip MPA 5.1 verwendet. Dieser Chip präsentiert 610 verschiedene putative Glykanliganden. Die CFG array Nummern stellen die Identifikationsnummern der verschiedenen Glykane dar, die auf jedem Chip in der gleichen Reihenfolge angeordnet und im Anhang 6.5 aufgeführt sind. Die Verdünnungen wurden mit Proteinkonzentrationen von 50 µg/ml (Epa9A und Epa23A) oder 20 µg/ml (Epa1A oder Epa12A) vermessen. Die Bindungsaffinität zu den einzelnen Glykanen spiegelt sich in den verschiedenen Fluoreszenzintensitäten (relativen Fluoreszenz / RFU) wider.

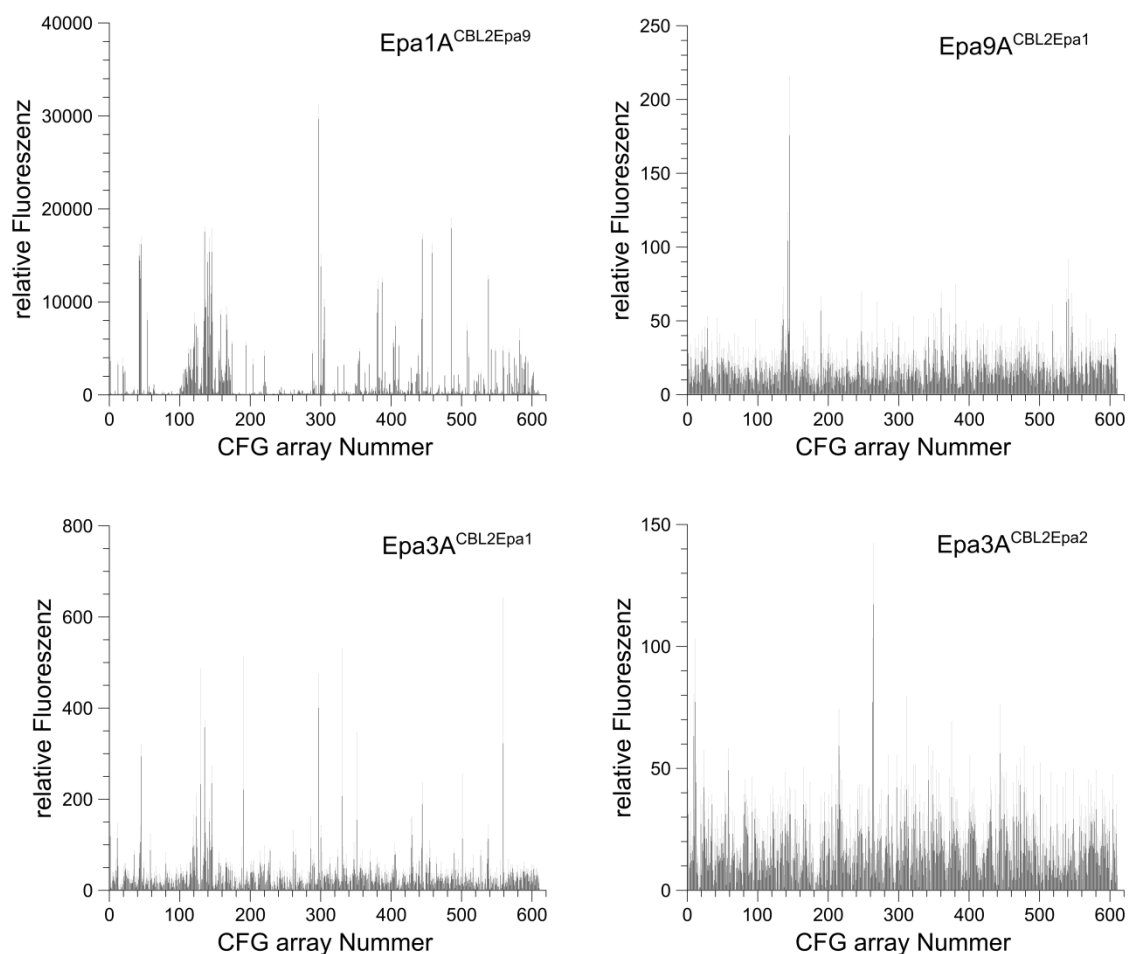


Abbildung 69: Bindungsspezifitätsprofile von EpaA CBL2-Austauschvarianten.

Es wurde der Glykan-Chip MPA V5.1 verwendet. Dieser Chip präsentiert 610 verschiedene putative Glykanliganden. Die CFG array Nummern stellen die Identifikationsnummern der verschiedenen Glykane dar, die auf jedem Chip in der gleichen Reihenfolge angeordnet und im Anhang 6.5 aufgeführt sind. Alle Profile wurden bei einer Proteinkonzentration von 200 µg/ml aufgenommen. Die Bindungsaffinität zu den einzelnen Glykanen spiegelt sich in den verschiedenen Fluoreszenzintensitäten (relativen Fluoreszenz / RFU) wider.

6.6 Ligandenbindungsspezifitätsprofile

Tabelle 43: Verteilung der durch die EpaA-Domänen gebundenen Glykane des Glykan-Chips MPA V5.1, die eine relative Fluoreszenzintensität von ≥ 20 % des bestgebundenen Liganden aufweisen (Abbildung 20).

20 %	Epa1	Epa2	Epa3	Epa6	Epa7	Epa8	Epa9	Epa10	Epa11	Epa12	Epa13	Epa15	Epa19	Epa20	Epa21	Epa22	Epa23
Gal α 1-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gal α 1-3	0	4	0	7	0	4	13	0	3	11	2	0	3	1	1	0	0
Gal α 1-4	0	4	0	5	0	2	6	2	1	4	6	0	3	1	2	1	0
Gal α 1-6	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
Gal β 1-2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Gal β 1-3	11	6	6	5	9	7	10	5	2	1	0	0	8	1	1	7	0
Gal β 1-4	9	11	0	0	0	8	26	1	1	3	1	0	14	9	6	0	2
Gal β 1-6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(3S)Gal β 1-3	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
(3S)Gal β 1-4	0	2	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	3	1	2	0	0
(6S)Gal β 1-3	0	0	0	0	0	2	0	2	0	2	0	1	1	0	0	0	0
(6S)Gal β 1-4	0	2	0	0	0	3	1	2	0	4	1	3	2	2	1	0	5
6S(3S)Gal β 1-4	0	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	2	1	1	0	0
keine Gal	3	57	0	1	0	34	3	1	10	2	0	0	65	23	19	0	0
andere Gal	0	7	0	1	0	5	0	1	2	0	0	0	9	1	1	0	0
Gesamt	23	96	6	21	9	69	59	14	20	27	12	5	111	40	34	8	7

Tabelle 44: Verteilung der durch die EpaA-Domänen gebundenen Glykane des Glykan-Chips MPA V5.1, die eine relative Fluoreszenzintensität von ≥ 50 % des bestgebundenen Liganden aufweisen (Abbildung 20).

50 %	Epa1	Epa2	Epa3	Epa6	Epa7	Epa8	Epa9	Epa10	Epa11	Epa12	Epa13	Epa15	Epa19	Epa20	Epa21	Epa22	Epa23
Gal α 1-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gal α 1-3	0	0	0	1	0	1	3	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Gal α 1-4	0	0	0	2	0	0	2	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Gal α 1-6	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Gal β 1-2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gal β 1-3	5	0	3	1	4	2	2	0	0	0	0	0	1	0	0	2	0
Gal β 1-4	0	1	0	0	0	2	4	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
Gal β 1-6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(3S)Gal β 1-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(3S)Gal β 1-4	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
(6S)Gal β 1-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(6S)Gal β 1-4	0	0	0	0	0	1	0	2	0	2	0	2	0	0	0	0	3
6S(3S)Gal β 1-4	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
keine Gal	0	5	0	0	0	14	0	0	0	0	0	0	14	6	4	0	0
andere Gal	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0
Gesamt	5	8	3	6	4	22	11	3	1	2	2	2	18	7	6	2	3

Tabelle 45: Verteilung der durch die EpaA-Domänen gebundenen Glykane des Glykan-Chips MPA V5.1, die eine relative Fluoreszenzintensität von $\geq 20\%$ des bestgebundenen Liganden aufweisen und mit geringeren Proteinkonzentrationen ermittelt wurden (Abbildung 27).

20 %	Epa1	Epa9	Epa12	Epa23	Epa1^{CB2Epa9}
Gal α 1-2	1	3	2	0	0
Gal α 1-3	0	0	0	0	0
Gal α 1-4	0	0	0	0	0
Gal α 1-6	0	10	7	0	0
Gal β 1-2	0	6	5	0	0
Gal β 1-3	0	0	1	0	0
Gal β 1-4	0	0	0	0	0
Gal β 1-6	8	8	2	0	7
(3S)Gal β 1-3	2	25	1	3	0
(3S)Gal β 1-4	0	0	0	0	0
(6S)Gal β 1-3	0	0	0	0	0
(6S)Gal β 1-4	0	0	0	0	0
6S(3S)Gal β 1-4	0	0	2	0	2
keine Gal	0	1	4	5	5
andere Gal	0	0	0	0	0
Gesamt	11	53	24	8	14

Tabelle 46: Verteilung der durch die EpaA-Domänen gebundenen Glykane des Glykan-Chips MPA V5.1, die eine relative Fluoreszenzintensität von $\geq 50\%$ des bestgebundenen Liganden aufweisen und mit geringeren Proteinkonzentrationen ermittelt wurden (Abbildung 27).

50 %	Epa1	Epa9	Epa12	Epa23	Epa1^{CB2Epa9}
Gal α 1-2	0	0	0	0	0
Gal α 1-3	0	0	0	0	0
Gal α 1-4	0	0	0	0	0
Gal α 1-6	0	2	0	0	0
Gal β 1-2	0	2	2	0	0
Gal β 1-3	0	0	0	0	0
Gal β 1-4	0	0	0	0	0
Gal β 1-6	4	3	0	0	1
(3S)Gal β 1-3	0	4	0	0	0
(3S)Gal β 1-4	0	0	0	0	0
(6S)Gal β 1-3	0	0	0	0	0
(6S)Gal β 1-4	0	0	0	0	0
6S(3S)Gal β 1-4	0	0	0	0	0
keine Gal	0	0	0	4	4
andere Gal	0	0	0	0	0
Gesamt	4	11	2	4	5

Tabelle 47: Verteilung der durch die EpaA CBL2-Austauschvarianten gebundenen Glykane des Glykan-Chips MPA V5.1, die eine relative Fluoreszenzintensität von ≥ 20 % des bestgebundenen Liganden aufweisen (Abbildung 41).

20 %	Epa1	Epa2	Epa3	Epa6	Epa9	Epa1 ^{CBL2Epa8}	Epa9 ^{CBL2Epa1}	Epa3 ^{CBL2Epa1}	Epa3 ^{CBL2Epa2}
Gal α 1-2	3	57	0	1	3	0	4	6	35
Gal α 1-3	0	7	0	1	0	0	1	0	4
Gal α 1-4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gal α 1-6	0	4	0	7	13	0	0	2	0
Gal β 1-2	0	4	0	5	6	2	0	1	4
Gal β 1-3	0	0	0	1	0	0	0	1	0
Gal β 1-4	0	0	0	1	0	1	0	0	0
Gal β 1-6	11	6	6	5	10	9	5	9	9
(3S)Gal β 1-3	9	11	0	0	26	5	3	1	13
(3S)Gal β 1-4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(6S)Gal β 1-3	0	1	0	0	0	0	0	0	1
(6S)Gal β 1-4	0	2	0	0	0	0	0	0	1
6S(3S)Gal β 1-4	0	0	0	0	0	2	0	2	2
keine Gal	0	2	0	0	1	5	0	4	1
andere Gal	0	2	0	0	0	0	0	0	1
Gesamt	23	96	6	21	59	24	13	26	71

Tabelle 48: Verteilung der durch die EpaA CBL2-Austauschvarianten gebundenen Glykane des Glykan-Chips MPA V5.1, die eine relative Fluoreszenzintensität von ≥ 50 % des bestgebundenen Liganden aufweisen (Abbildung 41).

50 %	Epa1	Epa2	Epa3	Epa6	Epa9	Epa1 ^{CBL2Epa8}	Epa9 ^{CBL2Epa1}	Epa3 ^{CBL2Epa1}	Epa3 ^{CBL2Epa2}
Gal α 1-2	0	5	0	0	0	0	0	2	2
Gal α 1-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gal α 1-4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gal α 1-6	0	0	0	1	3	0	0	0	0
Gal β 1-2	0	0	0	2	2	0	0	0	0
Gal β 1-3	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Gal β 1-4	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Gal β 1-6	5	0	3	1	2	2	2	1	0
(3S)Gal β 1-3	0	1	0	0	4	1	0	1	0
(3S)Gal β 1-4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(6S)Gal β 1-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(6S)Gal β 1-4	0	1	0	0	0	0	0	0	0
6S(3S)Gal β 1-4	0	0	0	0	0	1	0	0	0
keine Gal	0	0	0	0	0	3	0	2	0
andere Gal	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Gesamt	5	8	3	6	11	7	2	6	2

Tabelle 49: Verteilung der durch die EpaA CBL2-Austauschvarianten gebundenen Glykane des Glykan-Chips MPA V4.1, die eine relative Fluoreszenzintensität von ≥ 20 % des bestgebundenen Liganden aufweisen (Abbildung 56).

20 %	Epa1	Epa2	Epa3	Epa6	Epa9	Epa1 ^{CBL2Epa9}	Epa9 ^{CBL2Epa1}	Epa3 ^{CBL2Epa1}	Epa3 ^{CBL2Epa2}	Epa1	Epa1 ^{CBL2Epa2}	Epa1 ^{CBL2Epa3}	Epa1 ^{CBL2Epa6}
Gal α 1-2	2	73	0	1	1	0	3	5	28	3	1	0	1
Gal α 1-3	0	7	0	1	0	0	0	0	4	0	0	0	0
Gal α 1-4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gal α 1-6	0	6	0	5	8	0	0	1	0	0	2	0	5
Gal β 1-2	0	6	0	5	6	2	0	1	4	1	2	3	4
Gal β 1-3	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1
Gal β 1-4	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1
Gal β 1-6	9	7	5	4	8	8	4	8	9	10	3	0	5
(3S)Gal β 1-3	5	10	0	0	18	5	1	0	7	15	0	0	10
(3S)Gal β 1-4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
(6S)Gal β 1-3	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
(6S)Gal β 1-4	0	4	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
6S(3S)Gal β 1-4	0	0	0	0	0	2	0	2	2	0	2	1	1
keine Gal	0	2	0	0	1	5	0	4	1	5	3	2	1
andere Gal	0	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Gesamt	16	118	5	18	42	23	8	22	58	35	15	7	30

Tabelle 50: Verteilung der durch die EpaA CBL2-Austauschvarianten gebundenen Glykane des Glykan-Chips MPA V4.1, die eine relative Fluoreszenzintensität von ≥ 50 % des bestgebundenen Liganden aufweisen (Abbildung 56).

50 %	Epa1	Epa2	Epa3	Epa6	Epa9	Epa1 ^{CBL2Epa9}	Epa9 ^{CBL2Epa1}	Epa3 ^{CBL2Epa1}	Epa3 ^{CBL2Epa2}	Epa1	Epa1 ^{CBL2Epa2}	Epa1 ^{CBL2Epa3}	Epa1 ^{CBL2Epa6}
Gal α 1-2	0	11	0	0	0	0	0	2	2	0	1	0	1
Gal α 1-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gal α 1-4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gal α 1-6	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	1
Gal β 1-2	0	1	0	2	3	0	0	0	0	0	1	2	1
Gal β 1-3	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gal β 1-4	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gal β 1-6	4	2	2	1	3	2	2	1	0	4	1	0	3
(3S)Gal β 1-3	0	2	0	0	2	1	0	0	0	6	0	0	0
(3S)Gal β 1-4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(6S)Gal β 1-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(6S)Gal β 1-4	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6S(3S)Gal β 1-4	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
keine Gal	0	1	0	0	0	3	0	2	0	0	1	1	0
andere Gal	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gesamt	4	20	3	6	10	7	2	5	2	10	5	3	6

6.7 Fluoreszenztitration

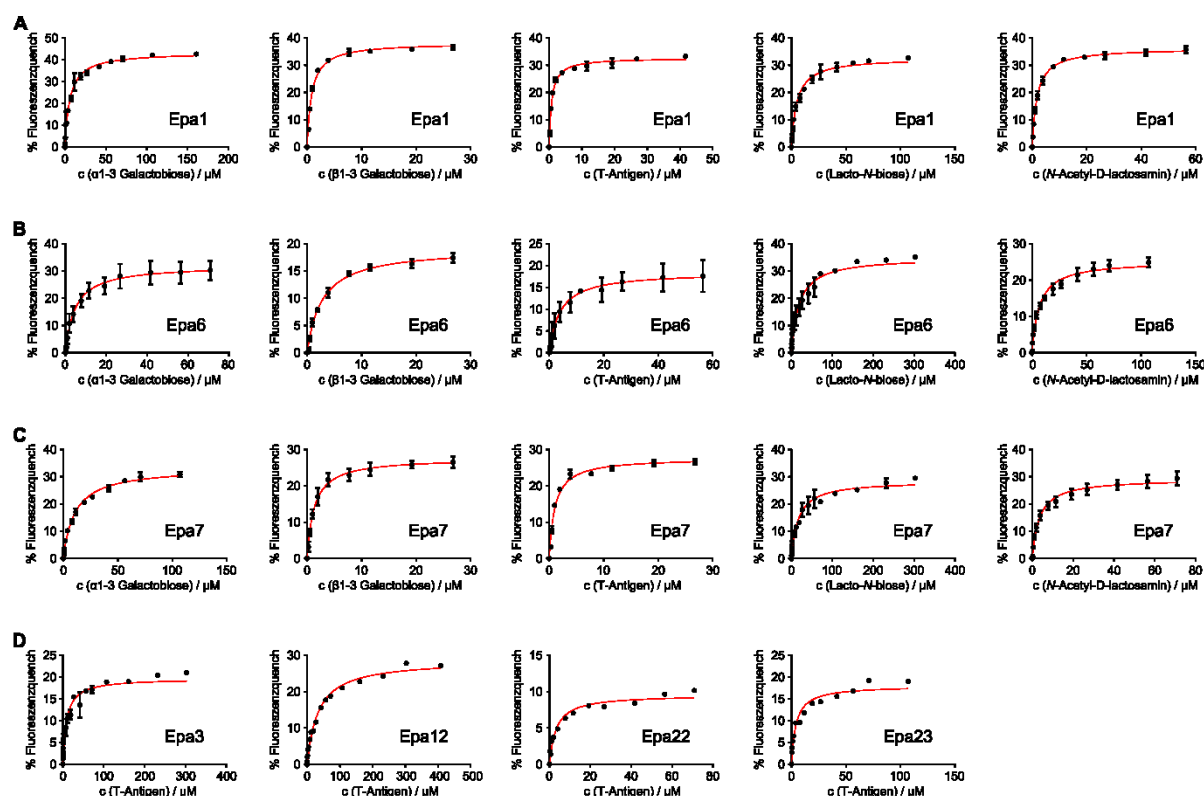


Abbildung 70: Fluoreszenzmessungen einzelner EpaA-Domänen mit verschiedenen Glykanliganden.

Für die Ermittlung der Fluoreszenztitrationskurven wurde der gemessene Fluoreszenzquench gegen die vorliegende Ligandkonzentration aufgetragen. Anschließend wurde die erhaltene Kurve mit dem Programm *Prism6* (*GraphPad Software*) durch die Funktion für eine Bindungsstelle angeglichen. Anhand des Fits konnten die Bindungskonstanten der einzelnen EpaA-Domänen zu den jeweiligen Liganden ermittelt werden.

6.8 Kristallisationsscreens

Die Bedingungen der einzelnen Kristallisationsscreens können auf der Homepage von *Qiagen* eingesehen werden:

<http://www.qiagen.com/products/protein/crystallization/compositiontables/default.aspx>

6.9 Datensammlungs- und Verfeinerungsstatistiken

Tabelle 51: Epa6A Datensammlungsstatistiken.

Protein	Epa6A	Epa6A	Epa6A	Epa6A	Epa6A
Ligand	Lactose	T-Antigen	<i>N</i> -Acetyl-D-lactosamin	Lacto- <i>N</i> -biose	α -Galactobiose
X-ray source	14.1, BESSY	P14, PETRA III	14.1, BESSY	P14, PETRA III	14.1, BESSY
Wavelength (Å)	0.91841	0.826606	0.918409	0.826606	0.918409
Cell dimensions (Å)	a=41.3, b=61.1, c=106.3	a=41.35, b=61.10, c=106.61	a=41.47, b=63.33, c=110.25	a=41.28, b=61.26, c=106.62	a=41.52, b=63.29, c=110.30
Resolution (Å)	28.77 – 1.48 (1.56 – 1.48)	34.24 - 2.00 (2.11 – 2.00)	41.58 - 1.80 (1.90 - 1.80)	53.12 - 2.25 (2.37 - 2.25)	41.58 - 1.50 (1.58 - 1.50)
Observed reflections	174129	109348	146305	120749	257032
Unique reflections	45573	18879	27537	13420	47367
Completeness (%)	99.7 (99.9)	99.8 (99.7)	99.5 (99.5)	99.9 (100)	99.9 (99.9)
Multiplicity	3.8 (3.8)	5.8 (5.7)	5.3 (5.0)	9.0 (9.2)	5.4 (5.2)
Mean I/sigma(I)	21.1 (2.9)	11.9 (2.7)	17.1 (4.4)	12.1 (3.5)	20.7 (3.0)
R _{merge} (%)	4.4 (57.1)	12.3 (60.4)	9.2 (40.4)	17.3 (64.7)	4.6 (52.0)

Tabelle 52: Epa9A Datensammlungsstatistiken.

Protein	Epa9A	Epa9A	Epa9A
Ligand	Lactose	<i>N</i> -Acetyl-D-lactosam	Lacto- <i>N</i> -biose
X-ray source	14.1, BESSY	14.1, BESSY	14.1, BESSY
Wavelength (Å)	0.91841	0.918409	0.91841
Cell dimensions (Å)	a=66.58, b=66.58, c=117.95	a=66.84, b=66.84, c=115.95	a=66.66, b=66.66, c=117.67
Resolution (Å)	41.23 - 2.15 (2.27 - 2.15)	40.96 - 2.58 (2.72 - 2.58)	41.21 - 2.50 (2.64 - 2.50)
Observed reflections	186187	79850	52916
Unique reflections	17016	9889	10922
Completeness (%)	99.9 (100)	99.9 (100)	99.7 (99.9)
Multiplicity	10.9 (11.1)	8.1 (8.0)	4.8 (4.9)
Mean I/sigma(I)	24.9 (4.9)	15.7 (3.7)	12.5 (3.4)
R _{merge} (%)	9.9 (59.2)	12.3 (57.8)	13.7 (50.7)

Tabelle 53: Epa6A Verfeinerungsstatistiken.

Protein	Epa6A	Epa6A	Epa6A	Epa6A	Epa6A
Ligand	Lactose	T-Antigen	Lacto-N-biose	N-Acetyl-D-lactosamin	α1-3 Galactobiose
Resolution (Å)	26.50 – 1.48	32.69 – 2.15	53.17 – 2.30	41.58 – 1.80	41.58 – 1.50
$R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$ (%)	14.4 / 17.2	17.7 / 23.0	17.8 / 22.0	18.7 / 22.3	15.0 / 17.6
Reflections					
Total	44337	14534	11930	26129	46100
Test set	1173	740	624	1378	1223
Number of atoms					
Total	2109	2056	2013	2197	2219
Water	245	198	178	320	338
mean B value (Å ²)	19.167	25.137	23.917	16.266	20.24
R.m.s deviations					
Bond lengths (Å)	0.008	0.01	0.008	0.01	0.007
Bond angles (°)	1.295	1.319	1.209	1.384	1.134

Tabelle 54: Epa9A Verfeinerungsstatistiken.

Protein	Epa9A	Epa9A	Epa9A
Ligand	Lactose	Lacto-N-biose	N-Acetyl-D-lactosamin
Resolution (Å)	41.23 – 2.15	33.35 – 2.50	41.00 – 2.60
$R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$ (%)	16.3 / 19.4	17.0 / 23.1	18.1 / 24.2
Reflections			
Total	16140	10356	9180
Test set	857	549	492
Number of atoms			
Total	2043	2008	1930
Water	198	159	82
mean B value (Å ²)	27.86	21.827	36.072
R.m.s deviations			
Bond lengths (Å)	0.009	0.012	0.009
Bond angles (°)	1.263	1.498	1.33

6.10 In der PDB deponierte Proteinstrukturen

Maestre Reyna M, Diderrich R, Veelders M, Eulenburg G, Kalugin V, Brückner S, Keller P, Rupp S, Mösch, H-U & Essen L-O

4AF9 Structure of Epithelial Adhesin 1 A domain (Epa1A) from *Candida glabrata* in complex with Galb1-3Glc

4AFA	Crystal Structure of subtype-switched Epithelial Adhesin 1 to 2 A domain (Epa1to2A) from <i>Candida glabrata</i> in complex with glycerol
4AFB	Crystal Structure of subtype-switched Epithelial Adhesin 1 to 3 A domain (Epa1to3A) from <i>Candida glabrata</i> in complex with glycerol
4AFC	Crystal Structure of subtype-switched Epithelial Adhesin 1 to 6 A domain (Epa1to6A) from <i>Candida glabrata</i> in complex with Galb1-3Glc

Diderrich R, Kock M, Maestre Reyna M, Keller P, Rupp S, Essen L-O, Mösch, H-U

4COU	Structure of Epithelial Adhesin 6 A domain (Epa6A) from <i>Candida glabrata</i> in complex with Galb1-4Glc
4COV	Structure of Epithelial Adhesin 6 A domain (Epa6A) from <i>Candida glabrata</i> in complex with Gala1-3Gal
4COW	Structure of Epithelial Adhesin 6 A domain (Epa6A) from <i>Candida glabrata</i> in complex with Galb1-3GalNAc
4COY	Structure of Epithelial Adhesin 6 A domain (Epa6A) from <i>Candida glabrata</i> in complex with Galb1-4GlcNAc
4COZ	Structure of Epithelial Adhesin 6 A domain (Epa6A) from <i>Candida glabrata</i> in complex with Galb1-3GlcNAc
4CP0	Structure of Epithelial Adhesin 9 A domain (Epa9A) from <i>Candida glabrata</i> in complex with Galb1-4Glc
4CP1	Structure of Epithelial Adhesin 9 A domain (Epa9A) from <i>Candida glabrata</i> in complex with Galb1-3GlcNAc
4CP2	Structure of Epithelial Adhesin 9 A domain (Epa9A) from <i>Candida glabrata</i> in complex with Galb1-4GlcNAc

7 Literaturverzeichnis

- Aguilar-Uscanga B & Francois JM (2003) A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. *Lett Appl Microbiol* **37**: 268-274.
- Baker NA, Sept D, Joseph S, Holst MJ & McCammon JA (2001) Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 10037-10041.
- Barnett A, Payne W. & Yarrow D. (1983) *Yeasts: Characteristics and Identification*.
- Bartman AE, Buisine MP, Aubert JP, *et al.* (1998) The MUC6 secretory mucin gene is expressed in a wide variety of epithelial tissues. *J Pathol* **186**: 398-405.
- Battye TG, Kontogiannis L, Johnson O, Powell HR & Leslie AG (2011) iMOSFLM: a new graphical interface for diffraction-image processing with MOSFLM. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **67**: 271-281.
- Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G & Brunak S (2004) Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* **340**: 783-795.
- Bennett J & Scott KJ (1971) Quantitative staining of fraction I protein in polyacrylamide gels using Coomassie brilliant blue. *Anal Biochem* **43**: 173-182.
- Bergfors T (2003) Seeds to crystals. *J Struct Biol* **142**: 66-76.
- Birnboim HC & Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 1513-1523.
- Blixt O, Head S, Mondala T, *et al.* (2004) Printed covalent glycan array for ligand profiling of diverse glycan binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 17033-17038.
- Blumberg HM, Jarvis WR, Soucie JM, *et al.* (2001) Risk factors for candidal bloodstream infections in surgical intensive care unit patients: the NEMIS prospective multicenter study. The National Epidemiology of Mycosis Survey. *Clin Infect Dis* **33**: 177-186.
- Bouchara JP, Zouhair R, Le Boudouil S, *et al.* (2000) In-vivo selection of an azole-resistant petite mutant of *Candida glabrata*. *J Med Microbiol* **49**: 977-984.
- Braman J, Papworth C & Greener A (1996) Site-directed mutagenesis using double-stranded plasmid DNA templates. *Methods Mol Biol* **57**: 31-44.
- Braun BR & Johnson AD (2000) TUP1, CPH1 and EFG1 make independent contributions to filamentation in *Candida albicans*. *Genetics* **155**: 57-67.
- Brockert PJ, Lachke SA, Srikantha T, Pujol C, Galask R & Soll DR (2003) Phenotypic switching and mating type switching of *Candida glabrata* at sites of colonization. *Infect Immun* **71**: 7109-7118.
- Brown AJ (1992) Monitoring polysaccharide synthesis in *Candida albicans*. *Carbohydr Res* **227**: 195-202.

- Brückner S & Mösch HU (2012) Choosing the right lifestyle: adhesion and development in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* **36**: 25-58.
- Brunger AT (1992) Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature* **355**: 472-475.
- Buffo J, Herman MA & Soll DR (1984) A characterization of pH-regulated dimorphism in *Candida albicans*. *Mycopathologia* **85**: 21-30.
- Cabib E, Blanco N, Grau C, Rodriguez-Pena JM & Arroyo J (2007) Crh1p and Crh2p are required for the cross-linking of chitin to beta(1-6)glucan in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Mol Microbiol* **63**: 921-935.
- Cappellaro C, Baldermann C, Rachel R & Tanner W (1994) Mating type-specific cell-cell recognition of *Saccharomyces cerevisiae*: cell wall attachment and active sites of a- and alpha-agglutinin. *EMBO J* **13**: 4737-4744.
- Casadevall A (2005) Fungal virulence, vertebrate endothermy, and dinosaur extinction: is there a connection? *Fungal Genet Biol* **42**: 98-106.
- Casadevall A, Rosas AL & Nosanchuk JD (2000) Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Curr Opin Microbiol* **3**: 354-358.
- Castano I, Pan SJ, Zupancic M, Hennequin C, Dujon B & Cormack BP (2005) Telomere length control and transcriptional regulation of subtelomeric adhesins in *Candida glabrata*. *Mol Microbiol* **55**: 1246-1258.
- Cavaliere D, McGovern PE, Hartl DL, Mortimer R & Polsinelli M (2003) Evidence for *S. cerevisiae* fermentation in ancient wine. *J Mol Evol* **57**: S226-232.
- Cereghino GP, Cereghino JL, Ilgen C & Cregg JM (2002) Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Curr Opin Biotechnol* **13**: 329-332.
- Chaffin WL, Lopez-Ribot JL, Casanova M, Gozalbo D & Martinez JP (1998) Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 130-180.
- Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T & Ghannoum MA (2001) Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol* **183**: 5385-5394.
- Collaborative Computational Project N (1994) The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **50**: 760-763.
- Cormack BP & Falkow S (1999) Efficient homologous and illegitimate recombination in the opportunistic yeast pathogen *Candida glabrata*. *Genetics* **151**: 979-987.
- Cormack BP, Ghori N & Falkow S (1999) An adhesin of the yeast pathogen *Candida glabrata* mediating adherence to human epithelial cells. *Science* **285**: 578-582.
- Cowen LE & Steinbach WJ (2008) Stress, drugs, and evolution: the role of cellular signaling in fungal drug resistance. *Eukaryot Cell* **7**: 747-764.
- Cregg JM, Tolstorukov I, Kusari A, Sunga J, Madden K & Chappell T (2009) Expression in the yeast *Pichia pastoris*. *Methods Enzymol* **463**: 169-189.

- Csank C & Haynes K (2000) *Candida glabrata* displays pseudohyphal growth. *FEMS Microbiol Lett* **189**: 115-120.
- da Silva WJ, Goncalves LM, Seneviratne J, Parahitiyawa N, Samaranayake LP & Del Bel Cury AA (2012) Exopolysaccharide matrix of developed *Candida albicans* biofilms after exposure to antifungal agents. *Braz Dent J* **23**: 716-722.
- Davies DR (1971) Protein Crystallization: Micro Techniques Involving Vapor Diffusion. *Methods Enzymol* **22**: 266-269.
- de Groot PW & Klis FM (2008) The conserved PA14 domain of cell wall-associated fungal adhesins governs their glycan-binding specificity. *Mol Microbiol* **68**: 535-537.
- de Groot PW, Hellingwerf KJ & Klis FM (2003) Genome-wide identification of fungal GPI proteins. *Yeast* **20**: 781-796.
- de Groot PW, Bader O, de Boer AD, Weig M & Chauhan N (2013) Adhesins in human fungal pathogens: glue with plenty of stick. *Eukaryot Cell* **12**: 470-481.
- de Groot PW, de Boer AD, Cunningham J, *et al.* (2004) Proteomic analysis of *Candida albicans* cell walls reveals covalently bound carbohydrate-active enzymes and adhesins. *Eukaryot Cell* **3**: 955-965.
- de Groot PW, Kraneveld EA, Yin QY, *et al.* (2008) The cell wall of the human pathogen *Candida glabrata*: differential incorporation of novel adhesin-like wall proteins. *Eukaryot Cell* **7**: 1951-1964.
- de Hoon MJ, Imoto S, Nolan J & Miyano S (2004) Open source clustering software. *Bioinformatics* **20**: 1453-1454.
- De Las Penas A, Pan SJ, Castano I, Alder J, Cregg R & Cormack BP (2003) Virulence-related surface glycoproteins in the yeast pathogen *Candida glabrata* are encoded in subtelomeric clusters and subject to RAP1- and SIR-dependent transcriptional silencing. *Genes Dev* **17**: 2245-2258.
- De Nobel JG, Klis FM, Ram A, Van Unen H, Priem J, Munnik T & Van Den Ende H (1991) Cyclic variations in the permeability of the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **7**: 589-598.
- DeLano WL (2002) The PyMOL molecular graphics system. ed.^eds.), p.^pp.
- Desai C, Mavrianos J & Chauhan N (2011) *Candida glabrata* Pwp7p and Aed1p are required for adherence to human endothelial cells. *FEMS Yeast Res* **11**: 595-601.
- Dieterich C, Schandar M, Noll M, Johannes FJ, Brunner H, Graeve T & Rupp S (2002) In vitro reconstructed human epithelia reveal contributions of *Candida albicans* EFG1 and CPH1 to adhesion and invasion. *Microbiology* **148**: 497-506.
- DiMaio F, Terwilliger TC, Read RJ, *et al.* (2011) Improved molecular replacement by density- and energy-guided protein structure optimization. *Nature* **473**: 540-543.
- Dodgson AR, Pujol C, Pfaller MA, Denning DW & Soll DR (2005) Evidence for recombination in *Candida glabrata*. *Fungal Genet Biol* **42**: 233-243.

- Dolan JW, Bell AC, Hube B, Schaller M, Warner TF & Balish E (2004) *Candida albicans* PLD I activity is required for full virulence. *Med Mycol* **42**: 439-447.
- Domergue R, Castano I, De Las Penas A, *et al.* (2005) Nicotinic acid limitation regulates silencing of *Candida* adhesins during UTI. *Science* **308**: 866-870.
- Douglas LJ (2002) Medical importance of biofilms in *Candida* infections. *Rev Iberoam Micol* **19**: 139-143.
- Douglas LJ (2003) *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol* **11**: 30-36.
- Dujon B, Sherman D, Fischer G, *et al.* (2004) Genome evolution in yeasts. *Nature* **430**: 35-44.
- Edmond MB, Wallace SE, McClish DK, Pfaller MA, Jones RN & Wenzel RP (1999) Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis. *Clin Infect Dis* **29**: 239-244.
- Eisen MB, Spellman PT, Brown PO & Botstein D (1998) Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 14863-14868.
- Emsley P, *et al.* (2010) Features and development of Coot. . *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **66**: 486-501.
- Eswar N, Webb B, Marti-Renom MA, *et al.* (2006) Comparative protein structure modeling using Modeller. *Curr Protoc Bioinformatics* **Chapter 5**: Unit 5 6.
- Ferrari S, Ischer F, Calabrese D, *et al.* (2009) Gain of function mutations in CgPDR1 of *Candida glabrata* not only mediate antifungal resistance but also enhance virulence. *PLoS Pathog* **5**: e1000268.
- Fidel PL, Jr., Vazquez JA & Sobel JD (1999) *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clin Microbiol Rev* **12**: 80-96.
- Filler SG (2006) *Candida*-host cell receptor-ligand interactions. *Curr Opin Microbiol* **9**: 333-339.
- Fleet GH (1985) Composition and structure of yeast cell walls. *Curr Top Med Mycol* **1**: 24-56.
- Fridkin SK & Jarvis WR (1996) Epidemiology of nosocomial fungal infections. *Clin Microbiol Rev* **9**: 499-511.
- Frieman MB, McCaffery JM & Cormack BP (2002) Modular domain structure in the *Candida glabrata* adhesin Epa1p, a beta1,6 glucan-cross-linked cell wall protein. *Mol Microbiol* **46**: 479-492.
- Fukuda M (2002) Roles of mucin-type O-glycans in cell adhesion. *Biochim Biophys Acta* **1573**: 394-405.
- Ghannoum MA (1999) Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin Microbiol Rev* **12**: 501-517.
- Ghannoum MA (2000) Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* **13**: 122-143.

- Gill SC & von Hippel PH (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem* **182**: 319-326.
- Gipson IK, Ho SB, Spurr-Michaud SJ, *et al.* (1997) Mucin genes expressed by human female reproductive tract epithelia. *Biol Reprod* **56**: 999-1011.
- Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, *et al.* (1996) Life with 6000 genes. *Science* **274**: 546, 563-547.
- Gonzalez M (2009) *Glycoconjugate structure and function in fungal cell walls*.
- Goossens K & Willaert R (2010) Flocculation protein structure and cell-cell adhesion mechanism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Lett* **32**: 1571-1585.
- Gow NA, Knox Y, Munro CA & Thompson WD (2003) Infection of chick chorioallantoic membrane (CAM) as a model for invasive hyphal growth and pathogenesis of *Candida albicans*. *Med Mycol* **41**: 331-338.
- Greenfield NJ (1996) Methods to estimate the conformation of proteins and polypeptides from circular dichroism data. *Anal Biochem* **235**: 1-10.
- Guarro J, GeneJ & Stchigel AM (1999) Developments in fungal taxonomy. *Clin Microbiol Rev* **12**: 454-500.
- Guery BP, Arendrup MC, Auzinger G, *et al.* (2009) Management of invasive candidiasis and candidemia in adult non-neutropenic intensive care unit patients: Part II. Treatment. *Intensive Care Med* **35**: 206-214.
- Gulia J, Aryal S, Saadlla H & Shorr AF (2010) Health care-associated candidemia--a distinct entity? *J Hosp Med* **5**: 298-301.
- Guo B, Styles CA, Feng Q & Fink GR (2000) A *Saccharomyces* gene family involved in invasive growth, cell-cell adhesion, and mating. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 12158-12163.
- Guthrie CF, G.R. (1991) *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology*.
- Hajjeh RA, Sofair AN, Harrison LH, *et al.* (2004) Incidence of bloodstream infections due to *Candida* species and in vitro susceptibilities of isolates collected from 1998 to 2000 in a population-based active surveillance program. *J Clin Microbiol* **42**: 1519-1527.
- Hassell AM, An G, Bledsoe RK, *et al.* (2007) Crystallization of protein-ligand complexes. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **63**: 72-79.
- Hatstrup CL & Gendler SJ (2008) Structure and function of the cell surface (tethered) mucins. *Annu Rev Physiol* **70**: 431-457.
- Henry KW, Nickels JT & Edlind TD (2000) Upregulation of ERG genes in *Candida* species by azoles and other sterol biosynthesis inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* **44**: 2693-2700.
- Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, *et al.* (2007) A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol Res* **111**: 509-547.
- Hinnen A, Hicks JB & Fink GR (1978) Transformation of yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**: 1929-1933.

- Hitchcock CA, Pye GW, Troke PF, Johnson EM & Warnock DW (1993) Fluconazole resistance in *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother* **37**: 1962-1965.
- Hoyer LL, Payne TL & Hecht JE (1998) Identification of *Candida albicans* ALS2 and ALS4 and localization of als proteins to the fungal cell surface. *J Bacteriol* **180**: 5334-5343.
- Iraqi I, Garcia-Sanchez S, Aubert S, Dromer F, Ghigo JM, d'Enfert C & Janbon G (2005) The Yak1p kinase controls expression of adhesins and biofilm formation in *Candida glabrata* in a Sir4p-dependent pathway. *Mol Microbiol* **55**: 1259-1271.
- Kabsch W (2010) Xds. *Acta crystallographica. Section D. Biological crystallography* **66**: 125-132.
- Kantarcioglu AS & Yucel A (2002) Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. *Mycoses* **45**: 160-165.
- Kapteyn JC, Van Den Ende H & Klis FM (1999) The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. *Biochim Biophys Acta* **1426**: 373-383.
- Kapteyn JC, Ram AF, Groos EM, *et al.* (1997) Altered extent of cross-linking of beta1,6-glucosylated mannoproteins to chitin in *Saccharomyces cerevisiae* mutants with reduced cell wall beta1,3-glucan content. *J Bacteriol* **179**: 6279-6284.
- Kaur R (2007) A family of glycosylphosphatidylinositol-linked aspartyl proteases is required for virulence of *Candida glabrata*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 7628-7633.
- Kaur R, Domergue R, Zupancic ML & Cormack BP (2005) A yeast by any other name: *Candida glabrata* and its interaction with the host. *Curr Opin Microbiol* **8**: 378-384.
- Kelly SM (2000) The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function. *Curr. Protein Pept. Sci* **1**: 349-384.
- Kingsman AJ, Stanway C & Kingsman SM (1987) The expression of homologous and heterologous genes in yeast. *Antonie Van Leeuwenhoek* **53**: 325-333.
- Klis FM, Boorsma A & De Groot PW (2006) Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **23**: 185-202.
- Klis FM, Mol P, Hellingwerf K & Brul S (2002) Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* **26**: 239-256.
- Knowles MR (2002) Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. *J Clin Invest* **109**: 571-577.
- Kobayashi O, Hayashi N, Kuroki R & Sone H (1998) Region of FLO1 proteins responsible for sugar recognition. *J Bacteriol* **180**: 6503-6510.
- Kolbinger A, Gao T, Brock D, *et al.* (2005) A cysteine-rich extracellular protein containing a PA14 domain mediates quorum sensing in *Dictyostelium discoideum*. *Eukaryot Cell* **4**: 991-998.
- Komshian SV, Uwaydah AK, Sobel JD & Crane LR (1989) Fungemia caused by *Candida* species and *Torulopsis glabrata* in the hospitalized patient: frequency, characteristics, and evaluation of factors influencing outcome. *Rev Infect Dis* **11**: 379-390.

- Krcmery V (1999) *Torulopsis glabrata* an emerging yeast pathogen in cancer patients. *Int J Antimicrob Agents* **11**: 1-6.
- Kuhn DM & Vyas VK (2012) The *Candida glabrata* adhesin Epa1p causes adhesion, phagocytosis, and cytokine secretion by innate immune cells. *FEMS Yeast Res* **12**: 398-414.
- Kumamoto CA (2002) *Candida* biofilms. *Curr Opin Microbiol* **5**: 608-611.
- Lachke SA, Joly S, Daniels K & Soll DR (2002) Phenotypic switching and filamentation in *Candida glabrata*. *Microbiology* **148**: 2661-2674.
- Lachke SA, Srikantha T, Tsai LK, Daniels K & Soll DR (2000) Phenotypic switching in *Candida glabrata* involves phase-specific regulation of the metallothionein gene MT-II and the newly discovered hemolysin gene HLP. *Infect Immun* **68**: 884-895.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lagow E, DeSouza MM & Carson DD (1999) Mammalian reproductive tract mucins. *Hum Reprod Update* **5**: 280-292.
- Langfelder K, Streibel M, Jahn B, Haase G & Brakhage AA (2003) Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. *Fungal Genet Biol* **38**: 143-158.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, *et al.* (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**: 2947-2948.
- Larsbrink J, Izumi A, Ibatullin FM, Nakhai A, Gilbert HJ, Davies GJ & Brumer H (2011) Structural and enzymatic characterization of a glycoside hydrolase family 31 alpha-xylosidase from *Cellvibrio japonicus* involved in xyloglucan saccharification. *Biochem J* **436**: 567-580.
- Lee KL, Buckley HR & Campbell CC (1975) An amino acid liquid synthetic medium for the development of mycelial and yeast forms of *Candida albicans*. *Sabouraudia* **13**: 148-153.
- Leslie AG, Powell HR, Winter G, *et al.* (2002) Automation of the collection and processing of X-ray diffraction data -- a generic approach. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **58**: 1924-1928.
- Lipke PN & Kurjan J (1992) Sexual agglutination in budding yeasts: structure, function, and regulation of adhesion glycoproteins. *Microbiol Rev* **56**: 180-194.
- Lo HJ, Kohler JR, DiDomenico B, Loebenberg D, Cacciapuoti A & Fink GR (1997) Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell* **90**: 939-949.
- Lupetti A, Danesi R, Campa M, Del Tacca M & Kelly S (2002) Molecular basis of resistance to azole antifungals. *Trends Mol Med* **8**: 76-81.
- MacCallum DM, Castillo L, Nather K, Munro CA, Brown AJ, Gow NA & Odds FC (2009) Property differences among the four major *Candida albicans* strain clades. *Eukaryot Cell* **8**: 373-387.
- Maestre-Reyna M, Diderrich R, Veelders MS, *et al.* (2012) Structural basis for promiscuity and specificity during *Candida glabrata* invasion of host epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 16864-16869.

- Marichal P, Vanden Bossche H, Odds FC, *et al.* (1997) Molecular biological characterization of an azole-resistant *Candida glabrata* isolate. *Antimicrob Agents Chemother* **41**: 2229-2237.
- Mayser P, Wenzel M, Kramer HJ, Kindler BL, Spiteller P & Haase G (2007) Production of indole pigments by *Candida glabrata*. *Med Mycol* **45**: 519-524.
- McCoy AJ, Grosse-Kunstleve RW, Adams PD, Winn MD, Storoni LC & Read RJ (2007) Phaser crystallographic software. *J Appl Crystallogr* **40**: 658-674.
- McEntyre J, Kornfeld, S., Varki, A., Sharon, N., Bertozzi, C., Rabuka, D., Esko, J., Colley, K., & Freeze H, Elbein, A. *et al.* (2009).
- McPherson A (1982) *Preparation and analysis of protein crystals*.
- Meaetre-Reyna M (2011) Structural and functional studies of mucin-interacting adhesion domains from *Candida glabrata* and *Helicobacter pylori*. Thesis.
- Miyazaki H, Miyazaki Y, Geber A, *et al.* (1998) Fluconazole resistance associated with drug efflux and increased transcription of a drug transporter gene, PDH1, in *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother* **42**: 1695-1701.
- Moen MD, Lyseng-Williamson KA & Scott LJ (2009) Liposomal amphotericin B: a review of its use as empirical therapy in febrile neutropenia and in the treatment of invasive fungal infections. *Drugs* **69**: 361-392.
- Moran GP, Sanglard D, Donnelly SM, Shanley DB, Sullivan DJ & Coleman DC (1998) Identification and expression of multidrug transporters responsible for fluconazole resistance in *Candida dubliniensis*. *Antimicrob Agents Chemother* **42**: 1819-1830.
- Morris RJ, Perrakis, A. & Lamzin, V.S. (2003) ARP/wARP and automatic interpretation of protein electron density maps. *Methods in enzymology* **374**: 229-244.
- Morschhäuser J (2003) Resistenzen und Resistenzmechanismen. *Pharm Unserer Zeit* **2**: 124-128.
- Mülhardt C (2002) Der Experimentator: Molekularbiologie, Genomics. *Spektrum, Akad. Verl.*
- Mullis KB & Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**: 335-350.
- Mundy RD & Cormack B (2009) Expression of *Candida glabrata* adhesins after exposure to chemical preservatives. *J Infect Dis* **199**: 1891-1898.
- Munshi S, Chen Z, Li Y, Olsen DB, Fraley ME, Hungate RW & Kuo LC (1998) Rapid X-ray diffraction analysis of HIV-1 protease-inhibitor complexes: inhibitor exchange in single crystals of the bound enzyme. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **54**: 1053-1060.
- Murshudov GN, Vagin, A.A. & Dodson, E.J. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta crystallographica. Section D*, **53**: 240-255.
- Naglik JR, Challacombe SJ & Hube B (2003) *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**: 400-428.
- Naglik JR, Albrecht A, Bader O & Hube B (2004) *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. *Cell Microbiol* **6**: 915-926.

- Naglik JR, Rodgers CA, Shirlaw PJ, *et al.* (2003) Differential expression of *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase and phospholipase B genes in humans correlates with active oral and vaginal infections. *J Infect Dis* **188**: 469-479.
- Netea MG, Brown GD, Kullberg BJ & Gow NA (2008) An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nat Rev Microbiol* **6**: 67-78.
- Nett J, Lincoln L, Marchillo K & Andes D (2007) Beta -1,3 glucan as a test for central venous catheter biofilm infection. *J Infect Dis* **195**: 1705-1712.
- Nett JE, Andes D.R (2012) Antifungals: drug class, mechanisms of action, pharmacokinetics/pharmacodynamics, drug-drug interactions, toxicity, and clinical use. *Candida and Candidiasis* 345-371.
- Nguyen MH, Peacock JE, Jr., Morris AJ, *et al.* (1996) The changing face of candidemia: emergence of non-*Candida albicans* species and antifungal resistance. *Am J Med* **100**: 617-623.
- Nieuw Amerongen AV (1998) Sulfomucins in the human body. *Biol Chem.* **379**: 1-18.
- Nikawa H, Nishimura H, Hamada T, Kumagai H & Samaranayake LP (1997) Effects of dietary sugars and, saliva and serum on *Candida* biofilm formation on acrylic surfaces. *Mycopathologia* **139**: 87-91.
- Notredame C, Higgins DG & Heringa J (2000) T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol Biol* **302**: 205-217.
- Nusbaum C, Mikkelsen TS, Zody MC, *et al.* (2006) DNA sequence and analysis of human chromosome 8. *Nature* **439**: 331-335.
- O'Sullivan O, Suhre K, Abergel C, Higgins DG & Notredame C (2004) 3DCoffee: combining protein sequences and structures within multiple sequence alignments. *J Mol Biol* **340**: 385-395.
- O'Toole GA, Pratt LA, Watnick PI, Newman DK, Weaver VB & Kolter R (1999) Genetic approaches to study of biofilms. *Methods Enzymol* **310**: 91-109.
- Odds FC (1988) *Candida and Candidosis: A Review and Bibliography*. Elsevier Science Health Science Division.
- Odds FC, Brown AJ & Gow NA (2003) Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol* **11**: 272-279.
- Odds FC, Rinaldi MG, Cooper CR, Jr., Fothergill A, Pasarell L & McGinnis MR (1997) *Candida* and *Torulopsis*: a blinded evaluation of use of pseudohypha formation as basis for identification of medically important yeasts. *J Clin Microbiol* **35**: 313-316.
- Osumi M (1998) The ultrastructure of yeast: cell wall structure and formation. *Micron* **29**: 207-233.
- Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, *et al.* (2009) Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* **48**: 503-535.
- Pardini G, De Groot PW, Coste AT, Karababa M, Klis FM, de Koster CG & Sanglard D (2006) The CRH family coding for cell wall glycosylphosphatidylinositol proteins with a predicted

transglycosidase domain affects cell wall organization and virulence of *Candida albicans*. *J Biol Chem* **281**: 40399-40411.

Perriere G & Gouy M (1996) WWW-query: an on-line retrieval system for biological sequence banks. *Biochimie* **78**: 364-369.

Petosa C, Collier RJ, Klimpel KR, Leppla SH & Liddington RC (1997) Crystal structure of the anthrax toxin protective antigen. *Nature* **385**: 833-838.

Pfaller MA & Diekema DJ (2007) Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* **20**: 133-163.

Pfaller MA, Diekema DJ, Messer SA, Hollis RJ & Jones RN (2003) In vitro activities of caspofungin compared with those of fluconazole and itraconazole against 3,959 clinical isolates of *Candida* spp., including 157 fluconazole-resistant isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **47**: 1068-1071.

Pfaller MA, Messer SA, Boyken L, Rice C, Tendolkar S, Hollis RJ & Diekema DJ (2003) Caspofungin activity against clinical isolates of fluconazole-resistant *Candida*. *J Clin Microbiol* **41**: 5729-5731.

Polakova S, Blume C, Zarate JA, Mentel M, Jorck-Ramberg D, Stenderup J & Piskur J (2009) Formation of new chromosomes as a virulence mechanism in yeast *Candida glabrata*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 2688-2693.

Popolo L, Gilardelli D, Bonfante P & Vai M (1997) Increase in chitin as an essential response to defects in assembly of cell wall polymers in the *ggp1*Δ mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **179**: 463-469.

Porath J & Flodin P (1959) Gel filtration: a method for desalting and group separation. *Nature* **183**: 1657-1659.

Porath J, Carlsson J, Olsson I & Belfrage G (1975) Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* **258**: 598-599.

Qiagen The Screens - an introduction.

Qiagen (2003) The QIAexpressionist.

Qiagen (2012) *NeXtal Composition Tables*.

R. P (2004) *Molecular Basis of Antifungal Resistance*.

Ramage G, Martinez JP & Lopez-Ribot JL (2006) *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. *FEMS Yeast Res* **6**: 979-986.

Reynolds TB & Fink GR (2001) Bakers' yeast, a model for fungal biofilm formation. *Science* **291**: 878-881.

Rhodes G (2006) *Crystallography made crystal clear a guide for users of macromolecular models*.

Rigden DJ, Mello LV & Galperin MY (2004) The PA14 domain, a conserved all-beta domain in bacterial toxins, enzymes, adhesins and signaling molecules. *Trends Biochem Sci* **29**: 335-339.

- Rosas-Hernandez LL, Juarez-Reyes A, Arroyo-Helguera OE, De Las Penas A, Pan SJ, Cormack BP & Castano I (2008) yKu70/yKu80 and Rif1 regulate silencing differentially at telomeres in *Candida glabrata*. *Eukaryot Cell* **7**: 2168-2178.
- Ruhnke M, Hartwig K & Kofla G (2008) New options for treatment of candidaemia in critically ill patients. *Clin Microbiol Infect* **14**: 46-54.
- Ruiz-Herrera J, Elorza MV, Valentin E & Sentandreu R (2006) Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity. *FEMS Yeast Res* **6**: 14-29.
- Russo CL, Spurr-Michaud S, Tisdale A, Pudney J, Anderson D & Gipson IK (2006) Mucin gene expression in human male urogenital tract epithelia. *Hum Reprod* **21**: 2783-2793.
- Saldanha AJ (2004) Java Treeview--extensible visualization of microarray data. *Bioinformatics* **20**: 3246-3248.
- Salgado PS, Yan R, Taylor JD, *et al.* (2011) Structural basis for the broad specificity to host-cell ligands by the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 15775-15779.
- Sandven P (2000) Epidemiology of candidemia. *Rev Iberoam Micol* **17**: 73-81.
- Sandven P, Giercksky KE, Group N & the Norwegian Yeast Study G (2001) Yeast colonization in surgical patients with intra-abdominal perforations. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **20**: 475-481.
- Sanglard D, Ischer F & Bille J (2001) Role of ATP-binding-cassette transporter genes in high-frequency acquisition of resistance to azole antifungals in *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother* **45**: 1174-1183.
- Sanglard D, Ischer F, Calabrese D, Majcherczyk PA & Bille J (1999) The ATP binding cassette transporter gene CgCDR1 from *Candida glabrata* is involved in the resistance of clinical isolates to azole antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother* **43**: 2753-2765.
- Saville SP, Lazzell AL, Bryant AP, *et al.* (2006) Inhibition of filamentation can be used to treat disseminated candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother* **50**: 3312-3316.
- Scherer SE & Muzny DM & Buhay CJ, *et al.* (2006) The finished DNA sequence of human chromosome 12. *Nature* **440**: 346-351.
- Schroeder JA, Thompson MC, Gardner MM & Gendler SJ (2001) Transgenic MUC1 interacts with epidermal growth factor receptor and correlates with mitogen-activated protein kinase activation in the mouse mammary gland. *J Biol Chem* **276**: 13057-13064.
- Sheehan JK, Kesimer M & Pickles R (2006) Innate immunity and mucus structure and function. *Novartis Found Symp* **279**: 155-166; discussion 167-159, 216-159.
- Sherman F (1986) Laboratory course manual for methods in yeast genetics. *Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Sherman F (1991) Getting started with yeast. *Methods Enzymol.* **194**: 3-21.
- Sitte P, H. Ziegler, F. Ehrendorfer (2002) Strasburger - Lehrbuch der Botanik,. *Spektrum Akad. Vlg., Heidelberg* 1007.

Smith AE, Zhang Z, Thomas CR, Moxham KE & Middelberg AP (2000) The mechanical properties of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 9871-9874.

Sobel JD (1988) Pathogenesis and epidemiology of vulvovaginal candidiasis. *Ann N Y Acad Sci* **544**: 547-557.

Sobel JD, Faro S, Force RW, *et al.* (1998) Vulvovaginal candidiasis: epidemiologic, diagnostic, and therapeutic considerations. *Am J Obstet Gynecol* **178**: 203-211.

Soll DR (1988) High-frequency switching in *Candida albicans* and its relations to vaginal candidiasis. *Am J Obstet Gynecol* **158**: 997-1001.

Srikantha T, Lachke SA & Soll DR (2003) Three mating type-like loci in *Candida glabrata*. *Eukaryot Cell* **2**: 328-340.

Srikantha T, Daniels KJ, Wu W, *et al.* (2008) Dark brown is the more virulent of the switch phenotypes of *Candida glabrata*. *Microbiology* **154**: 3309-3318.

Steinkellner G, Rader R, Thallinger GG, Kratky C & Gruber K (2009) VASCo: computation and visualization of annotated protein surface contacts. *BMC Bioinformatics* **10**: 32.

Tanny JC & Moazed D (2001) Coupling of histone deacetylation to NAD breakdown by the yeast silencing protein Sir2: Evidence for acetyl transfer from substrate to an NAD breakdown product. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 415-420.

Tortorano AM, Kibbler C, Peman J, Bernhardt H, Klingspor L & Grillot R (2006) Candidaemia in Europe: epidemiology and resistance. *Int J Antimicrob Agents* **27**: 359-366.

Tottrup HV & Carlsen S (1990) A process for the production of human proinsulin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng* **35**: 339-348.

Tumbarello M, Posteraro B, Trecarichi EM, *et al.* (2007) Biofilm production by *Candida* species and inadequate antifungal therapy as predictors of mortality for patients with candidemia. *J Clin Microbiol* **45**: 1843-1850.

Udenfriend S & Kodukula K (1995) How glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins are made. *Annu Rev Biochem* **64**: 563-591.

van der Vaart JM, van Schagen FS, Mooren AT, Chapman JW, Klis FM & Verrips CT (1996) The retention mechanism of cell wall proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. Wall-bound Cwp2p is beta-1,6-glucosylated. *Biochim Biophys Acta* **1291**: 206-214.

Vargas K, Srikantha R, Holke A, Sifri T, Morris R & Joly S (2004) *Candida albicans* switch phenotypes display differential levels of fitness. *Med Sci Monit* **10**: BR198-206.

Veelders M (2008) Flokkuline aus *Saccharomyces cerevisiae*: funktionelle und strukturelle Untersuchungen. Thesis.

Veelders M (2012) Struktur und Funktion von Flokkulinen aus *Saccharomyces cerevisiae* sowie weiterer pilzlicher Zellwandproteine. Thesis.

Veelders M, Bruckner S, Ott D, Unverzagt C, Mosch HU & Essen LO (2010) Structural basis of flocculin-mediated social behavior in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 22511-22516.

- Verstrepen KJ & Klis FM (2006) Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. *Mol Microbiol* **60**: 5-15.
- Verstrepen KJ & Fink GR (2009) Genetic and epigenetic mechanisms underlying cell-surface variability in protozoa and fungi. *Annu Rev Genet* **43**: 1-24.
- Verstrepen KJ, Reynolds TB & Fink GR (2004) Origins of variation in the fungal cell surface. *Nat Rev Microbiol* **2**: 533-540.
- Verstrepen KJ, Jansen A, Lewitter F & Fink GR (2005) Intragenic tandem repeats generate functional variability. *Nat Genet* **37**: 986-990.
- Vogelstein B & Gillespie D (1979) Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**: 615-619.
- Walker LA, Gow NA & Munro CA (2010) Fungal echinocandin resistance. *Fungal Genet Biol* **47**: 117-126.
- Weig M, Jansch L, Gross U, De Koster CG, Klis FM & De Groot PW (2004) Systematic identification in silico of covalently bound cell wall proteins and analysis of protein-polysaccharide linkages of the human pathogen *Candida glabrata*. *Microbiology* **150**: 3129-3144.
- Wilkins MR, Gasteiger E, Bairoch A, Sanchez JC, Williams KL, Appel RD & Hochstrasser DF (1999) Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. *Methods Mol Biol* **112**: 531-552.
- Willocks L, Leen CL, Brett RP, Urquhart D, Russell TB & Milne LJ (1991) Fluconazole resistance in AIDS patients. *J Antimicrob Chemother* **28**: 937-939.
- Wilson HA, Jr., Downes TR, Julian JS, White WL & Haponik EF (1993) *Candida* endocarditis. A treatable form of pacemaker infection. *Chest* **103**: 283-284.
- Wong S, Fares MA, Zimmermann W, Butler G & Wolfe KH (2003) Evidence from comparative genomics for a complete sexual cycle in the 'asexual' pathogenic yeast *Candida glabrata*. *Genome Biol* **4**: R10.
- Xie X & Lipke PN (2010) On the evolution of fungal and yeast cell walls. *Yeast* **27**: 479-488.
- Yoshida E, Hidaka M, Fushinobu S, *et al.* (2010) Role of a PA14 domain in determining substrate specificity of a glycoside hydrolase family 3 beta-glucosidase from *Kluyveromyces marxianus*. *Biochem J* **431**: 39-49.
- Zepelin B-v (2007) Epidemiology and antifungal susceptibilities of *Candida* spp. to six antifungal agents: results from a surveillance study on fungaemia in Germany from July 2004 to August 2005 *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **60**: 424-428.
- Zirkel J, Klinker H, Kuhn A, *et al.* (2012) Epidemiology of *Candida* blood stream infections in patients with hematological malignancies or solid tumors. *Med Mycol* **50**: 50-55.
- Zupancic ML, Frieman M, Smith D, Alvarez RA, Cummings RD & Cormack BP (2008) Glycan microarray analysis of *Candida glabrata* adhesin ligand specificity. *Mol Microbiol* **68**: 547-559.

8 Lebenslauf

Persönliches

RIKE DIDERRICH

Diplom Chemikerin

Adresse: Ferdinandstraße 17
40599 Düsseldorf

Geboren: 19.08.1983

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Ausbildung

- 10.2009-05.2014 **Promotion**, Philipps-Universität Marburg
Abteilung Molekulare Genetik, Prof. Dr. Hans-Ulrich Mösch
Thema: Strukturelle und funktionelle Charakterisierung der epithelialen Adhäsine aus *Candida glabrata*
- 10.2003-09.2009 **Studium der Chemie**, Philipps-Universität Marburg
Fachgebiete: Anorganik, Organik, Physikalische Chemie, Biochemie
Diplomarbeit, Philipps-Universität Marburg
Abteilung Strukturbiochemie, Prof. Dr. Lars-Oliver Essen
Thema: Strukturelle und funktionelle Analyse der GAF-Domänen in Cyanobakteriochromen
- 08.1900-06.2003 Europaschule Gladenbach, Abschluss: **Abitur**

Studienbegleitende Tätigkeiten

- 10.2010-04.2014 Mitglied des DFG-Graduiertenkolleg 1216 „Intra- and Inter-Cellular Transport and Communication“ der Philipps-Universität Marburg

Publikationen

Maestre Reyna M, Diderrich R, Veelders M, Eulenburg G, Kalugin V, Brückner S, Keller P, Rupp S, Mösch, H-U, Essen L-O, *Structural basis for promiscuity and specificity during Candida glabrata invasion of host epithelia*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012 109 (42): p. 16864 – 16869

Diderrich R, Kock M, Maestre Reyna M, Keller P, Rupp S, Essen L-O, Mösch, H-U, *Structural and functional characterization of the whole EPA family from the human pathogen Candida glabrata*. In preparation.

Konferenzbeiträge

10th VAAM Symposium Molecular Biology of Fungi, 2011

Diderrich, R, Maestre-Reyna M, Essen L-O, Mösch H-U, *Structural and functional characterization of epithelial adhesins from the human pathogen Candida glabrata*.

2th Intra- and Inter-Cellular Transport and Communication, 2011

Diderrich, R, Maestre-Reyna M, Essen L-O, Mösch H-U, *Structural and functional characterization of epithelial adhesins from the human pathogen Candida glabrata*.

11th European Conference on Fungal Genetics, 2012

Diderrich, R, Maestre-Reyna M, Essen L-O, Mösch H-U, *Structural and functional characterization of epithelial adhesins from the human pathogen Candida glabrata*.

5th FEBS Fifth FEBS Advanced Lecture Course Human Fungal Pathogens, 2013

Diderrich R, Maestre Reyna M, Veelders M, Eulenburg G, Kalugin V, Brückner S, Keller P, Rupp S, Essen L-O, Mösch, H-U, *Structural basis for promiscuity and specificity during Candida glabrata invasion of host epithelia*.

9 Danksagung

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Dr. Hans-Ulrich Mösch für die anspruchsvolle Themenstellung, die hilfreichen Denkanstöße und Anregungen sowie das Interesse, das er dieser Arbeit entgegenbrachte, bedanken.

Herrn Prof. Dr. Lars-Oliver Essen danke ich für eine hervorragende Kooperation, ein stets offenes Ohr bei Problemen und Fragen sowie für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit.

Ein besonderer Dank gilt Michael Kock und Manuel Maestre-Reyna für die produktive Zusammenarbeit auf dem Epa-Thema. Besonders möchte ich mich nochmal bei Michael Kock bedanken, der die in dieser Arbeit vorgestellten Proteinstrukturen gelöst hat.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Dr. Steffen Rupp und Petra Keller für die tolle Kooperation und die Ermöglichung der Adhäsionsassays an Epithelzellen bedanken. Ich hatte wirklich eine sehr schöne Zeit bei den mehrfachen Laboraufenthalten im Schwabenlände.

In diesem Zusammenhang möchte ich mich bei dem Graduiertenkolleg 1216 der DFG für die finanzielle Unterstützung und die Ermöglichung der Aufenthalte in den Laboren von Kooperationspartnern und die Teilnahme an Tagungen und Seminaren bedanken.

Herrn Dr. Uwe Linne möchte ich für die massenspektrometrischen Messungen und Bestimmungen danken und Ralf Pöschke für die Pipettierung der Kristallisationsscreens.

Meinen super Master- und Bachelorstudentinnen Lisa Ludewig, Cornelia Hillenbrad und Lisanne Heim möchte ich besonders danken. Ihr habt mir eure Betreuung wirklich leicht gemacht und exzellente Leistungen auf Teilgebieten dieser Arbeit erbracht.

Bei allen derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Mösch und Taxis möchte ich mich für die tolle Arbeitsatmosphäre, die vielen Spieleabende und Krimidinner sowie schönen Ausflüge bedanken. Ein besonderer Dank gilt zudem Christian Renicke für seine aufopferungsvolle Hilfe bei allen möglichen Fragen und

Probleme sowie Diana Kruhl für die tolle Unterstützung bei der Proteinexpression und -reinigung.

Ganz besonders möchte ich mich bei all meinen Freunden und meiner Familie bedanken. DANKE, dass ihr immer für mich da wart und seid. DANKE, dass ihr immer Verständnis dafür mich hattet. Ich freue mich schon auf weitere grandiose Zeiten mit euch. Zudem möchte ich mich auch noch ganz besonders bei meinem Freund Marc bedanken, der nicht nur diese Arbeit das ein oder andere mal korrigieren musste, sondern mich jederzeit, egal in welcher Lage ich war, super unterstützt hat. P.S. Ich liebe Dich! :*

Zuletzt möchte ich mich noch einmal ganz besonders bei meinen Eltern Christiane und Gaston für die jahrelange Unterstützung in vielerlei Hinsicht bedanken, ohne eure Hilfe wäre diese Arbeit wohl nie zustande gekommen. VIELEN DANK DAFÜR!!!